

UNIVERSITE DE GENEVE

Faculté des sciences

Département de biologie moléculaire

Professeur Pierre-François Spahr
Faculté des sciences

Département de biochimie médicale

Professeur Simonne Rous
Faculté de médecine

METABOLISME A COURT TERME DES ATOMES DE CARBONE ET D'HYDROGENE
DE L'ACETATE CHEZ LA SOURIS VIVANTE

T H E S E

présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

par

Pierre-Yves FAVARGER

de

Genève (Suisse)

Thèse No 1631

GENEVE

Imprimerie de la Section de Physique

1973

UNIVERSITE DE GENEVE

Faculté des sciences

Département de biologie moléculaire

Professeur Pierre-François Spahr
Faculté des sciences

Département de biochimie médicale

Professeur Simonne Rous
Faculté de médecine

METABOLISME A COURT TERME DES ATOMES DE CARBONE ET D'HYDROGENE
DE L'ACETATE CHEZ LA SOURIS VIVANTE

T H E S E

présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

par

Pierre-Yves FAVARGER

de

Genève (Suisse)

Thèse No 1631

GENEVE

Imprimerie de la Section de Physique

1973

La Faculté des sciences, sur le préavis du professeur P.-F. SPAHR, directeur de thèse, et d'une commission composée des professeurs S. ROUS, Faculté de médecine, et M. KOBR, Faculté des sciences, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

GENEVE, le 5 octobre 1973

Le Doyen :

Thèse 1631

Jean MULLER



Je tiens à exprimer à mon père, le professeur P. Favarger, ainsi qu'au professeur S. Rous, ma reconnaissance et ma gratitude pour les encouragements et les conseils qu'ils m'ont constamment prodigués au cours de ce travail.

Mes remerciements vont aussi au professeur P.F. Spahr, qui a bien voulu présenter cette thèse à la Faculté des Sciences, ainsi qu'au professeur M. Kobr, qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545931_0005

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
2. TECHNIQUES	4
2.1. Traitement des animaux	5
2.2. Extraction des acides gras	6
2.3. Séparation des acides gras saturés et non-saturés	7
2.4. Chromatographie	8
2.5. Décarboxylations	10
2.6. Mesure de la radioactivité	14
2.7. Glucose sanguin	17
2.8. $^{14}\text{CO}_2$	18
2.9. Combustion de l'acétate- ^{14}C par les mitochondries	20
2.10. Vérification de l'activité injectée	21
3. RESULTATS et discussion préliminaire	23
3.1. Introduction	23
3.2. Répartition du ^{14}C de l'acétate 1- ^{14}C dans les C pairs et impairs des acides gras	23
3.3. Utilisation de l'hydrogène de l'acétate dans la synthèse des acides gras	25
3.4. Incorporation de l'acétate 1- et 2- ^{14}C , et du pyruvate 2- et 3- ^{14}C dans les acides gras et le glucose sanguin, 3 minutes après l'injection	29
3.5. Incorporation de l'acétate 1- et 2- ^{14}C et du pyruvate 2- et 3- ^{14}C dans les acides gras et le glucose sanguin 3 minutes après l'injection, en présence de fluoroacétate	35
3.6. Incorporation du butyrate 1- ou 2- ^{14}C dans le glucose sanguin et les acides gras 10 minutes après l'injection	36
3.7. Effet du butyrate froid en excès sur l'incorporation du butyrate 1- ^{14}C dans les acides gras et le glucose sanguin	38
3.8. Incorporation dans le tissu adipeux épидидymal, du butyrate 1- ^{14}C dans les acides myristique, palmitique et stéarique et dans leurs carboxyles	39
3.9. Passage du ^{14}C de l'acétate 1- ou 2- ^{14}C dans le CO_2 tissulaire	41

3.10.	Passage du ^{14}C de l'acétate 1- ou 2- ^{14}C dans le CO_2 tissulaire et dans le CO_2 respiratoire, 3 et 15 minutes après l'injection	44
3.11.	Expérience "in vitro" : combustion de l'acétate 1- ou 2- ^{14}C par les mitochondries de foie de souris	46
4.	DISCUSSION et CONCLUSIONS	48
4.1.	Introduction	48
4.2.	Mise au point préliminaire	48
4.3.	Réutilisation ou conservation de l'hydrogène de l'acétate dans les acides gras	49
4.4.	Passage de l'acétate 1- ou 2- ^{14}C dans le glucose sanguin	51
4.5.	Passage du pyruvate 2- ou 3- ^{14}C dans le glucose sanguin	51
4.6.	Incorporation des acétates 1- et 2- ^{14}C , des butyrates 1- et 2- ^{14}C et des pyruvates 2- et 3- ^{14}C dans les acides gras	52
4.7.	Combustion dans les tissus	53
	BIBLIOGRAPHIE	55

1. INTRODUCTION

L'acétyl-CoA constitue le centre du métabolisme énergétique de presque tous les êtres vivants. Il représente en effet la porte d'entrée dans le cycle de Krebs et dans la synthèse des acides gras, et les atomes de carbone de presque tous nos constituants doivent passer au moins une fois sous forme d'acétyl-CoA.

En lisant les articles généraux consacrés à la dégradation des glucides, à la lipogenèse et à la gluconéogenèse, on peut avoir l'impression que tout a été dit sur ces problèmes et que l'image représentant le métabolisme intermédiaire des glucides et des lipides est à peu près définitive. Mais la légitimité des méthodes expérimentales qui ont conduit à cette image est parfois si mal établie que l'on se doit de remettre en question certains de ses aspects. En effet, pour en rester au problème de la destinée des éléments dicarbonés, on a principalement le choix entre deux procédés qui ne sont satisfaisants ni l'un ni l'autre.

On peut d'abord opter pour les expériences in vitro, qui permettent d'utiliser comme précurseur l'acétyl-CoA. Cette substance est mise en présence d'enzymes extraits de cellules, ou plus souvent de fractions cellulaires plus complexes isolées simplement par homogénéisation puis centrifugation. On reconstitue tant bien que mal pour chaque fraction étudiée un milieu propre au déroulement des réactions que l'on escompte, mais dans lequel on se trouve toujours très éloigné des conditions réelles; la plupart des réactions sont en effet ralenties dans des proportions énormes, un facteur de l'ordre de 100 ou même 1000 étant parfaitement courant. Quant à la distribution spatiale des enzymes, de leurs activateurs et de leurs inhibiteurs, elle ne peut être au mieux qu'une caricature de la réalité : les mitochondries sont en partie lésées, fragmentées, leur membrane interne déformée; quant au réticulum endoplasmique, dont la structure semble nécessaire au déroulement des étapes réactionnelles, il est coupé en fragments qui ont reconstitué ces "microsomes" dont on aimerait bien savoir ce qu'ils ont de commun avec le réticulum original, si ce n'est la composition chimique globale. Les biochimistes qui ont néanmoins obtenu des résultats cohérents par

ces techniques ont souvent reconnu que seules des possibilités réactionnelles pouvaient être établies de cette manière, et que toute interprétation quantitative devait être exclue.

Si au contraire on choisit d'expérimenter sur l'animal vivant, on doit renoncer à utiliser le précurseur physiologique, c'est-à-dire l'acétyl-CoA, car il serait hydrolysé avant de parvenir aux lieux d'utilisation. On se contente donc le plus souvent d'injecter de l'acétate libre en escomptant son activation rapide dans le cytoplasme ou les mitochondries par l'acétyl-CoA synthétase (acétate : CoA ligase (AMP) EC 6.2.1.1.). Mais il est discutable d'utiliser comme traceur une substance dont la concentration dans les milieux à étudier est probablement très faible, même si son importance fonctionnelle paraît très grande à la lumière de travaux récents (1). En outre, c'est dans la mitochondrie et non pas à l'extérieur que naît l'acétyl-CoA d'origine naturelle (par décarboxylation oxydative du pyruvate ou dégradation des acides gras). Au contraire, l'acétate radioactif exogène apparaît précisément à l'extérieur, pouvant ainsi mettre artificiellement en relief une voie métabolique extra-mitochondriale, à moins que l'équilibration entre l'acétate (ou l'acétyl-CoA) intra- et extra-mitochondrial ne soit suffisamment rapide.

Le but du présent travail est, en premier lieu, de déterminer dans quelle mesure ces critiques de l'expérimentation sur l'animal vivant doivent être prises en considération. Parallèlement, nous nous sommes proposé de voir si la pénétration de l'acétate exogène dans les mitochondries avant sa participation à la synthèse des acides gras était différente dans le foie et le tissu adipeux, qui sont les deux tissus les plus importants pour la lipogenèse.

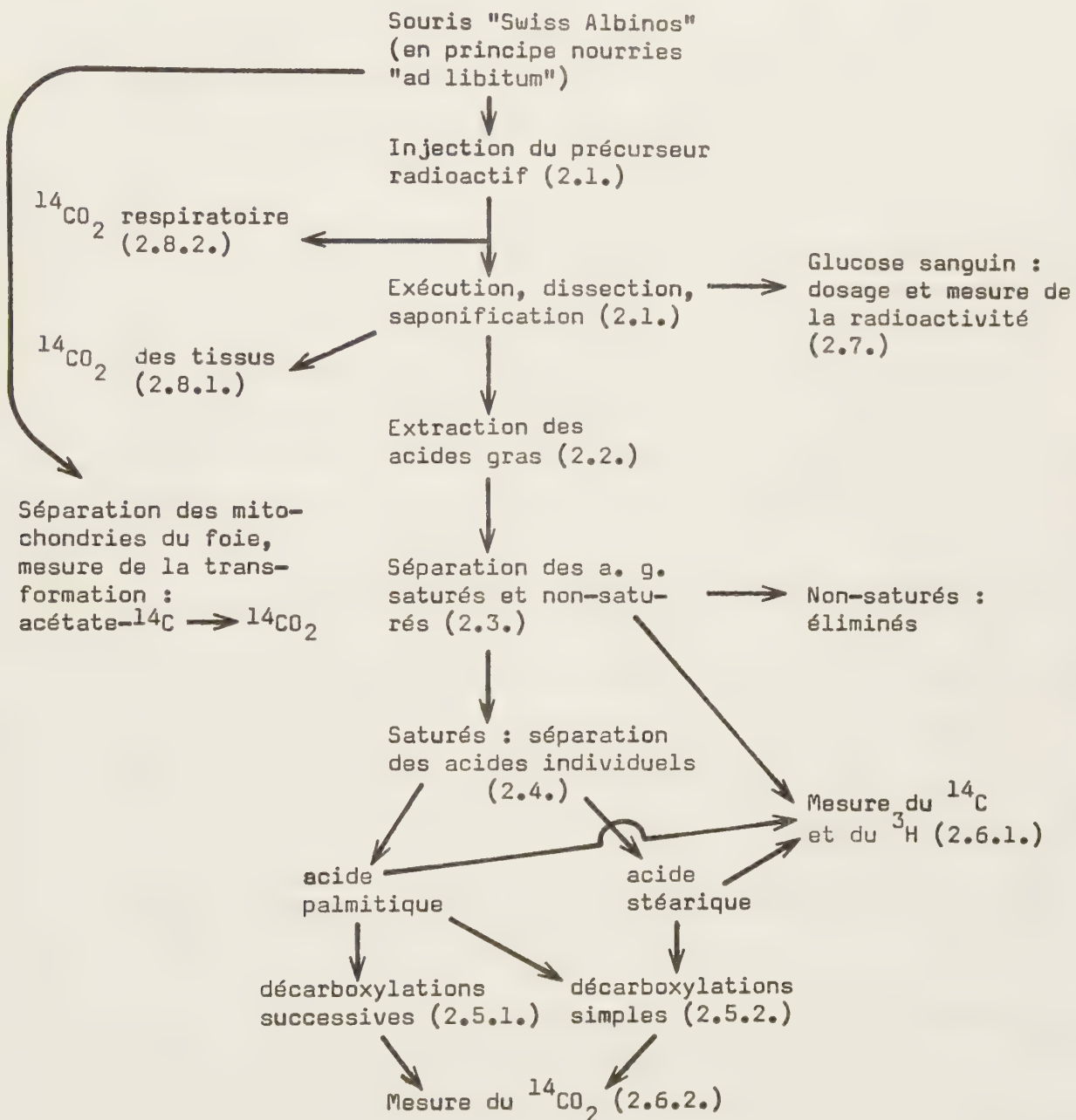
En outre, les résultats obtenus permettent de préciser deux questions plus concrètes : tout d'abord, pour la fraction du pyruvate dévolue à la gluconéogenèse, l'importance relative de sa carboxylation en oxaloacétate et de sa décarboxylation en acétyl-CoA; ensuite, pour les intermédiaires du cycle de Krebs, le nombre moyen de tours qu'ils effectuent (avec, à chaque tour, combustion et renouvellement de deux atomes de carbone) avant d'être utilisés dans une voie étrangère à la combustion.

Enfin, deux autres aspects de la destinée de l'acétate ont encore retenu notre attention. D'une part, une étude préliminaire technique était indispensable à toute interprétation de résultats fondée sur la différence de métabolisation des acétates 1- et 2-¹⁴C. Un ancien travail de Dauben (2) laissait en effet penser qu'une proportion non-négligeable de la radioactivité de l'acétate 1-¹⁴C se retrouvait dans les carbones pairs des acides gras. Les mécanismes réactionnels connus ne peuvent donner aucune explication satisfaisante. Nous avons donc repris le problème pour savoir si cette observation n'était pas simplement due aux imperfections techniques de cette époque. D'autre part, nous désirions vérifier si les éléments dicarbonés qui s'ajoutent les uns aux autres conservent la même proportion d'hydrogène original lorsqu'il s'agit du mécanisme de condensation simultanée (mécanisme dit extramitochondrial) ou du mécanisme d'élongation (mitochondrial).

Nous avons donc injecté à la souris vivante les acétates 2-³H, 1-¹⁴C et 2-¹⁴C, ainsi que des métabolites proches de l'acétate tels que le pyruvate (2- et 3-¹⁴C) et le butyrate (1- et 2-¹⁴C), et mesuré la radioactivité retrouvée dans le glucose sanguin, les acides gras, le CO₂ respiratoire et le CO₂ tissulaire (c'est-à-dire la partie du CO₂ qui, au moment du sacrifice de l'animal, se trouve encore dans les tissus, principalement sous forme de HCO₃⁻). Nous avons également comparé la combustions des acétates 1- et 2-¹⁴C in vitro sur des suspensions de mitochondries de foie.

2. TECHNIQUES

Voici le schéma général des techniques utilisées au cours de ce travail :



Annexe : 2.10. Vérification de l'activité injectée

Les techniques 2.3.2. (extraction des acides gras hydroxylés) et 2.5.2. (décarboxylation simple) ont été passablement modifiées; la technique 2.8.1. (libération du CO_2 des tissus) n'avait, à notre connaissance, jamais été utilisée.

2.1. Traitement des animaux

Les souris (Swiss albinos) proviennent toutes de l'élevage du Département de Biochimie Médicale, leur alimentation (dite "normale") est la suivante : nuit avant l'expérience, aliment pour rongeurs "Nafag", "ad libitum"; puis, jusqu'au temps t de l'expérience qui a lieu en principe l'après-midi, 1 g d'aliment "Nafag" toutes les 2 ou 3 heures, le dernier repas ayant lieu entre $t - 90$ min et $t - 240$ min.

Au temps t , l'animal est sacrifié par décapitation, le sang recueilli dans un bécher de 100 ml contenant 10 à 30 mg de NaF (anti-coagulant), le foie, les graisses blanches épидидymales et la carcasse immédiatement isolés et fixés dans des solutions de KOH alcoolique bouillante. Ces solutions, dans lesquelles l'ébullition est poursuivie pendant 4 heures afin d'obtenir une saponification des tissus aussi complète que possible, ont la composition suivante :

	KOH	éthanol (azéotrope)	eau*	dans un erlenmeyer de
Carcasse	15 g	100 ml	-	250 ml
T. adipeux épididymal	1,5 g	35 ml	1 ml	100 ml
Foie	2 g	35 ml	1 ml	100 ml

* Pour le foie et le tissu adipeux, il y a lieu d'ajouter 1 ml d'eau car ces organes n'en contiennent pas assez pour permettre la dissolution totale de la potasse caustique.

Pour éviter l'évaporation de l'alcool, il est nécessaire de recouvrir les erlenmeyers (papier d'aluminium percé d'un trou). Il est en outre essentiel de compléter fréquemment le niveau d'alcool, car une concentration trop élevée en KOH se traduit par une quantité exagérée de produits de polymérisation solubles brunâtres très difficiles à éliminer par la suite et particulièrement gênants pour la mesure de la radioactivité par scintillation liquide.

2.2. Extraction des acides gras

On utilise les phases suivantes :

Phase I : Ether de pétrole "léger", redistillé (jusqu'à 56° C, principalement pentane-hexane).

Phase II : mélange de 1 volume d'eau distillée + 1 volume d'alcool fédéral (= éthanol azéotropique). Il est possible d'augmenter la proportion en alcool jusqu'à 4 volumes (2.3.2.2., p. 8); en revanche, si elle diminue trop, il y a apparition de mousses gênantes.

Après constitution de la phase II par dilution de la solution (alcoolique) de saponification avec un volume égal d'eau distillée bouillante, on en prélève une partie aliquote, correspondant à 10 - 100 mg d'acides gras, soit par exemple 1/20^e pour la carcasse, 1/6^e pour le tissu adipeux épидидymal et 1/3 pour le foie.

A moins qu'on ne désire par la suite séparer les acides gras individuels et les dégrader, cas dans lequel la méthode classique d'extraction sur la totalité sera préférable (3), cette modification présente les avantages suivants :

- les débris insolubles et le glycogène qui précipite au moment de l'addition d'eau (constitution de la phase II) sont facilement éliminés;
- on a la possibilité de travailler sur une autre partie de la solution pour libérer le $^{14}\text{CO}_2$ tissulaire (2.8.1.);
- la solution finale d'acides gras dans l'éther de pétrole peut être évaporée directement dans le flacon pour scintillation liquide taré : on économise ainsi deux opérations de pesée;
- les manipulations et le problème de la verrerie sont simplifiés par l'emploi d'ampoules à décantation plus petites (100 ml).

Les autres opérations d'extraction sont appliquées selon la technique classique (3) et sans modification importante, sinon que le "washing out" (adjonction d'une forte quantité de précurseur non-marqué), opération prévue en principe pour la fin de l'extraction, est effectué dès après l'extraction de l'insaponifiable. Après acidification de la phase II et deux extractions par l'éther de pétrole, réunification et lavage des deux phases I ainsi obtenues par de l'alcool 50 % propre, on évapore l'éther de pétrole dans des flacons

à scintillation liquide tarés. On pèse les acides gras et détermine leur radioactivité après les avoir dissous dans 15 ml de mélange scintillant-toluène (2.6.1.).

2.3. Séparation des acides gras saturés et non-saturés.

2.3.1. Chromatographie sur couche mince.

Cette technique (4, 5), basée sur l'affinité relative de la liaison $C = C$ et de l'ion Ag^+ est la seule qui soit utilisable si l'on désire isoler de façon non-destructive les acides gras insaturés. Si, comme dans ce travail, cette condition n'est pas requise, elle présente sur la technique d'hydroxylation (2.3.2.) plusieurs inconvénients :

- difficulté d'adaptation au caractère préparatif : il faut multiplier les plaques (6 à 10, parfois plus) pour obtenir une quantité suffisante;
- rendement relativement faible (60 - 80 %);
- obligation de méthyler préalablement les acides gras (cet inconvénient tombe si l'on poursuit avec (2.4.1.) qui exige également des esters méthyliques);
- complexité plus grande du matériel, grande surface de travail, lenteur, prix élevé ($AgNO_3$).

2.3.2. Séparation par hydroxylation.

2.3.2.1. Dihydroxylation de la fonction $-CH=CH-$.

Cette technique (6, 3) consiste à oxyder partiellement les acides gras monoinsaturés en leurs dérivés dihydroxylés (les di-insaturés en dérivés tétrahydroxylés, etc.) par un mélange H_2O_2 - $HCOOH$ - $HCOOC_2H_5$. L'agent d'oxydation étant en fait l'acide performique (HCO_3H), on obtient d'abord les dérivés diformylés qu'il convient de saponifier par KOH (très prudemment, en raison du danger d'explosion d' H_2O_2 et des peroxydes en milieu alcalin).

La séparation proprement dite a été modifiée comme suit :

2.3.2.2. Extraction des acides gras saturés (=non-hydroxylés).

Le mélange saponifié est transvasé dans une ampoule à décanter, acidifié (jusqu'à pH 1) par HCl 6N ou 9N et complété par de l'alcool et de l'éther de pétrole (2.2.,I) de façon à obtenir la composition suivante : eau 1 volume, alcool 4 volumes, éther de pétrole 5 volumes. On agite et élimine la phase inférieure (eau-alcool).

Malgré la forte concentration en alcool de la phase aqueuse, la répartition des acides gras saturés reste très en faveur de la phase éther de pétrole (nous avons vérifié le coefficient de partage pour l'acide palmitique dans ce mélange inusité : il est de 87,5% en faveur de la phase non-aqueuse), et, pour les opérations de routine dans lesquelles une récupération quantitative n'est pas nécessaire, une seule extraction suffit. Dans le cas contraire, 3 extractions donnent pratiquement 100 % en acides saturés, mais la contamination en acides hydroxylés approche 10 %.

On rince la phase éther de pétrole par un volume égal d'eau : alcool 1 : 1*, évapore et sèche dans des béchers de 100 ml tarés.

Chez la souris, la proportion d'acides gras saturés varie entre 28 et 41 % du total (état métabolique "normal").

2.4.1. Chromatographie gaz - liquide (G.L.C.).

Les deux techniques de séparation gaz-liquide exigent une méthylation préalable des acides gras (7); rendement : 95 - 100 %.

2.4.1.1. G.L.C. analytique.

Chromatographes Varian Aerograph, modèles 90 - P et A - 700. C'est une méthode rapide, extrêmement sensible et capable de différencier les acides gras saturés, mono-insaturés et di-insaturés ayant un même nombre d'atomes de carbone (5). Un exemple de chromatogramme est donné à la fig. 1.

2.4.1.2. G.L.C. préparative.

Cette technique (8, 5) est semblable à la chromatographie analytique avec une colonne plus longue et de plus gros diamètre. Malgré les apparences (fig. 2), elle est insuffisante pour la séparation des

* Tous les mélanges liquide : liquide s'entendent volume : volume.

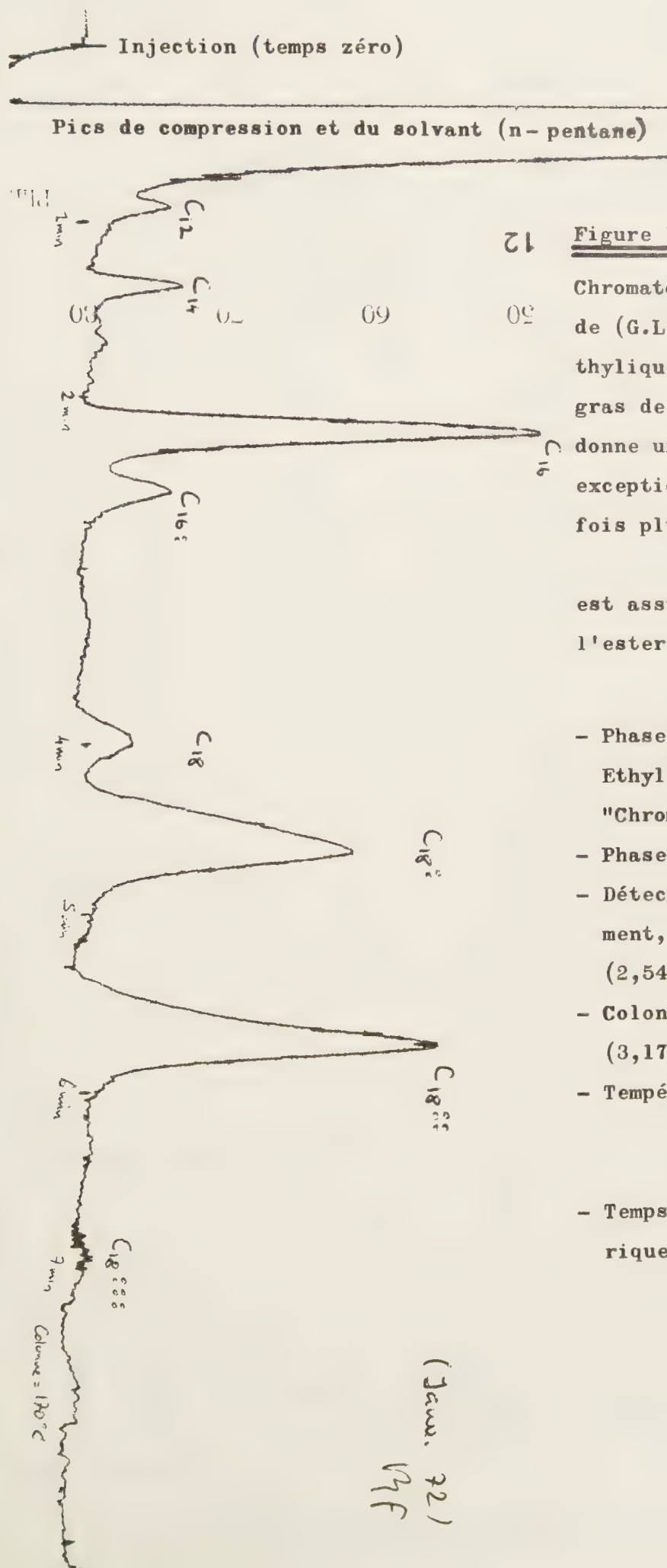


Figure 1 :

Chromatographie analytique gaz-liquide (G.L.C.) de 5-10 µg d'esters méthyliques obtenus à partir des acides gras de carcasse de Rat (la souris donne une répartition identique, à l'exception du linoléique, C_{18:2}, 5-10 fois plus faible).

La position de chaque pic est assurée par l'injection isolée de l'ester correspondant.

Conditions :

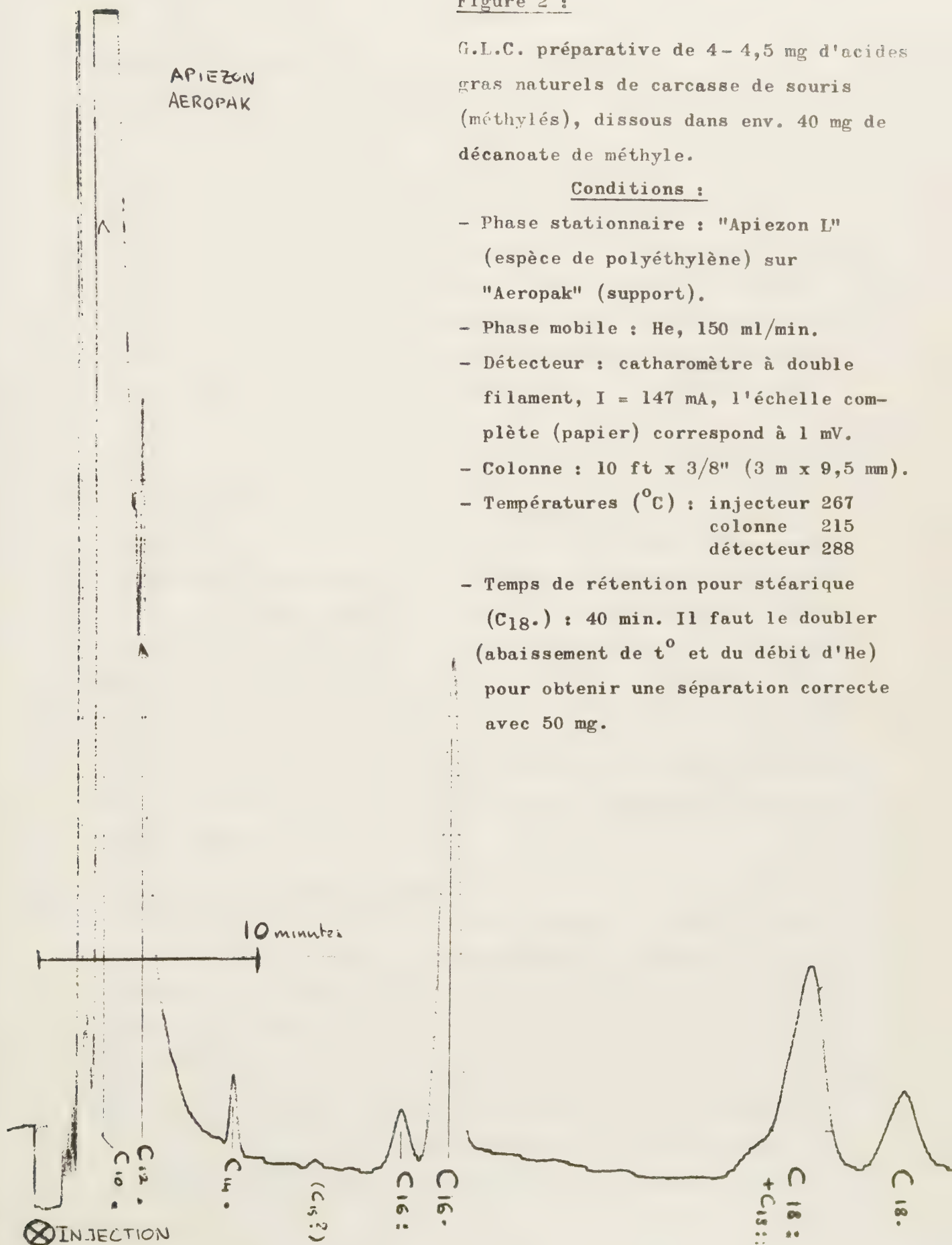
- Phase stationnaire : "DEGS" (=Di-EthyleneGlycolSuccinate) sur "Chromosorb" (support).
- Phase mobile : Hélium, 24 ml/min.
- Détecteur : catharomètre monofilament, 150 mA, signal 0,1 mV = 1" (2,54 cm) sur le papier.
- Colonne : 6 ft (1,86 m) sur 1/8" (3,17 mm) de diamètre.
- Températures (°C) : injecteur 265
colonne 170
détecteur 250
- Temps de rétention pour le stéarique : 4 minutes.

Figure 2 :

G.L.C. préparative de 4-4,5 mg d'acides gras naturels de carcasse de souris (méthylés), dissous dans env. 40 mg de décanoate de méthyle.

Conditions :

- Phase stationnaire : "Apiezon L" (espèce de polyéthylène) sur "Aeropak" (support).
- Phase mobile : He, 150 ml/min.
- Détecteur : catharomètre à double filament, I = 147 mA, l'échelle complète (papier) correspond à 1 mV.
- Colonne : 10 ft x 3/8" (3 m x 9,5 mm).
- Températures ($^{\circ}\text{C}$) : injecteur 267
colonne 215
détecteur 288
- Temps de rétention pour stéarique (C_{18}) : 40 min. Il faut le doubler (abaissement de t° et du débit d'He) pour obtenir une séparation correcte avec 50 mg.



45 μl C_{10} + 5 μl mélange ac. gras naturels de souris (méthylés)

acides gras saturés des non-saturés, dans ce sens que la fraction acide stéarique rechromatographiée analytiquement, se révèle contenir encore jusqu'à 30 % d'acide oléique.

Utilisée au début de ce travail, conjointement à la méthode de séparation des acides insaturés par couche mince (2.3.1.), elle a finalement été abandonnée pour les raisons suivantes :

- impossibilité de traiter plus de 50 mg d'esters méthyliques (saturés) en une opération avec les colonnes de 3/8" (dimension maximum);
- la formation d'aérosols à la sortie de la colonne (températures jusqu'à 260° C) rend très difficile la récupération des fractions, le rendement de récupération variant de façon incontrôlable entre 30 et 50 %;
- les deux constatations précédentes entraînent l'obligation d'effectuer un très grand nombre de chromatographies pour obtenir la quantité d'acide gras purifié nécessaire à certaines réactions (même pour le palmitique, il faut 20 chromatographies pour obtenir les 250 mg nécessaires aux décarboxylations oxydatives successives (2.5.1.).

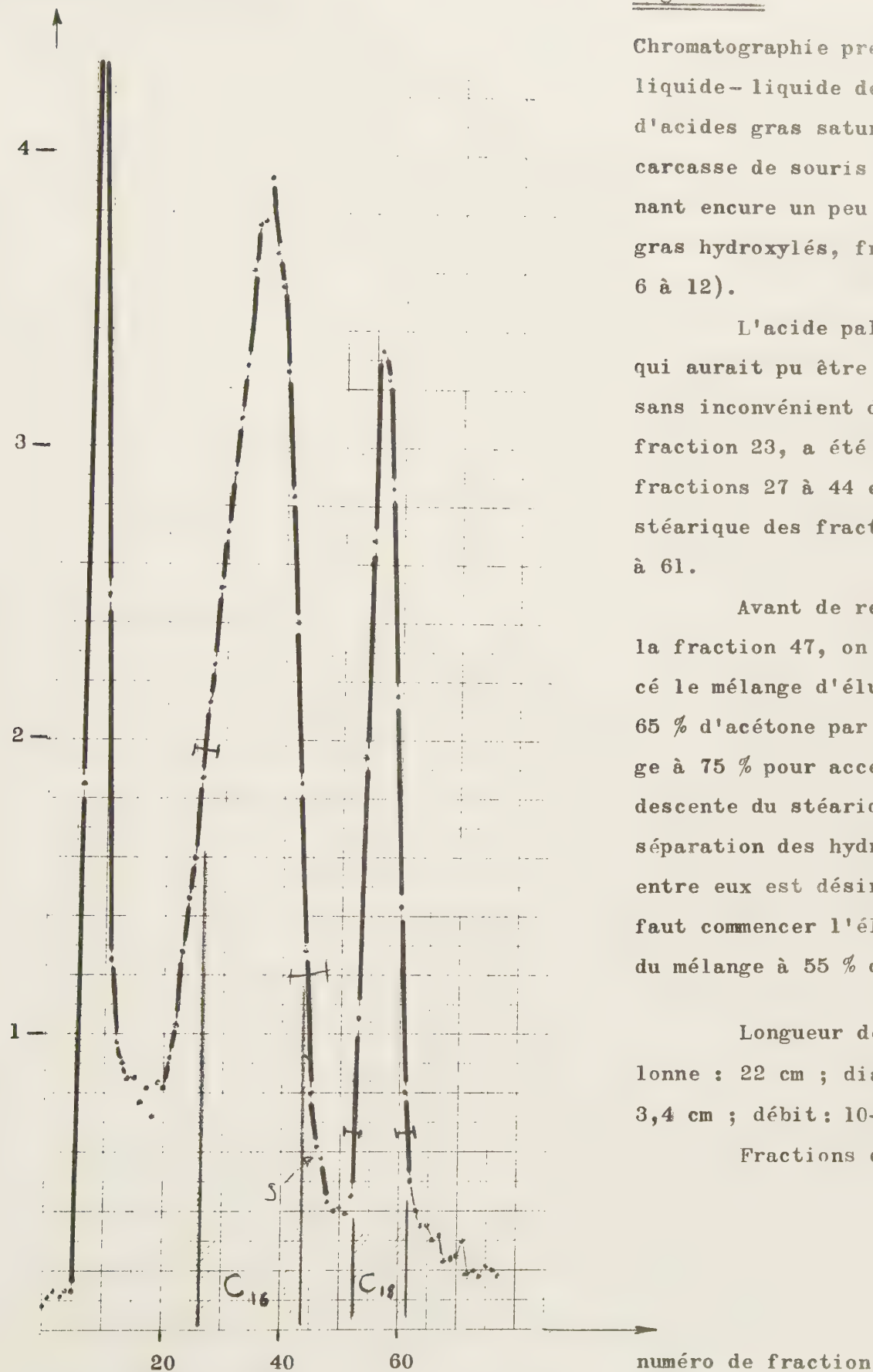
Il existe cependant une parade, qui n'a pas pu être appliquée pour des raisons de prix de revient et de sécurité : on pourrait injecter à l'animal 20 à 50 fois plus de ^{14}C ; on obtiendrait alors, pour une seule GLC préparative, quelques milligrammes de l'acide gras désiré avec une radioactivité spécifique très élevée. Il serait alors possible de la diluer par une forte quantité du même acide non marqué pour obtenir la quantité souhaitée, avec une radioactivité spécifique encore acceptable.

2.4.2. Chromatographie liquide-liquide.

Il s'agit de la méthode déjà ancienne de Howard et Martin (9, 3, 5), appelée également "chromatographie de partage" ou "chromatographie sur colonne", ce qui ne veut plus rien dire aujourd'hui que toutes les méthodes chromatographiques peuvent être considérées comme des chromatographies de partage, et que la majorité d'entre elles font appel à des colonnes. Par analogie avec la chromatographie gaz-liquide, nous l'appellerons donc désormais "chromatographie liquide-liquide".

La phase stationnaire est constituée par de l'huile de paraffine fixée sur de la cellite siliconée ("hyflo-Supercell"), et

ml KOH alcoolique 0,02 N



(1 cm² correspond à 0,04 meq)

Figure 3 :

Chromatographie préparative liquide-liquide de 235 mg d'acides gras saturés de carcasse de souris (contenant encore un peu d'acides gras hydroxylés, fractions 6 à 12).

L'acide palmitique, qui aurait pu être recueilli sans inconvénient dès la fraction 23, a été isolé des fractions 27 à 44 et l'acide stéarique des fractions 53 à 61.

Avant de recueillir la fraction 47, on a remplacé le mélange d'élution à 65 % d'acétone par du mélange à 75 % pour accélérer la descente du stéarique (si la séparation des hydroxylés entre eux est désirée, il faut commencer l'élution par du mélange à 55 % d'acétone).

Longueur de la colonne : 22 cm ; diamètre : 3,4 cm ; débit : 10-15 ml/min.
Fractions de 15 ml.

la phase mobile par des mélanges acétone : eau 55:45 à 75:25*, saturés d'huile de paraffine. Elle permet de séparer en une seule opération (2 à 3 h) jusqu'à 300 mg d'acides gras (dans les conditions données à la figure 3); Buchs (10) sépare jusqu'à 1000 mg avec une colonne de 4,5 cm de diamètre. Le rendement dépend de la pureté désirée (on peut recueillir ou non les fractions marginales), mais dépasse en tout cas 80 %.

En comparant les chromatogrammes obtenus par chromatographie gaz-liquide (fig. 2) ou liquide-liquide (fig. 3), on constate que cette dernière technique donne des pics beaucoup moins bien séparés, dénotant donc un nombre de plateaux théoriques très inférieur. Nous avons donc effectué des chromatographies analytiques (G.L.C.) de quelques uns des acides gras en C_{16} et C_{18} isolés par la technique liquide-liquide, afin de déterminer leur pureté. Pour un acide stéarique recueilli selon le chromatogramme de la fig. 3, la contamination en palmitique (cas le plus défavorable) est inférieure à 0,3 %

2.5. Décarboxylations.

2.5.1. Décarboxylations oxydatives successives.

Cette technique permet de transformer un acide gras donné en son homologue immédiatement inférieur et en CO_2 , le carbone No 2 de la molécule primitive étant oxydé en carboxyle. On peut ainsi enlever l'un après l'autre plusieurs atomes de carbone à la molécule et déterminer leur radioactivité; malheureusement, le mauvais rendement global des différentes opérations requises par chaque amputation limite cette technique aux 3 ou 4 premiers atomes de carbone. Les différents stades et leurs opérations ont été appliqués sans modification (11, 3); nous nous bornerons donc à rappeler les réactions :

Transformation de l'acide gras $R-CH_2-COOH$ en :

- 1) sel d'argent : $R-CH_2-COOH + AgNO_3 \longrightarrow R-CH_2-COOAg + HNO_3$
- 2) bromure d'alcoyle, $R-CH_2-COOAg + Br_2 \longrightarrow R-CH_2Br + AgBr + CO_2$
décarboxylation :
- 3) ester d'alcool gras : $R-CH_2Br + CH_3COOAg \longrightarrow R-CH_2OCOCH_3 + AgBr$
- 4) alcool gras : $R-CH_2OCOCH_3 + KOH \longrightarrow R-CH_2OH + CH_3COOK$
- 5) acide gras : $R-CH_2OH + (4/3)CrO_3 \longrightarrow R-COOH + (2/3)Cr_2O_3 + H_2O$

* Voir note p. 8.

La dernière étape est la plus délicate : son rendement optimum ne dépasse pas 65 % et le moindre écart de température, de concentration ou d'hydratation des réactifs se traduit par une oxydation incomplète de l'alcool gras, ou au contraire une oxydation trop forte avec formation exagérée des homologues inférieurs à l'acide gras qu'on désire obtenir (cette oxydation, chose curieuse, a l'air de se faire préférentiellement deux atomes de carbone par deux atomes de carbone, malgré son caractère purement chimique !).

La précipitation du sel d'argent (réaction No 1) par neutralisation au moyen d'ammoniaque 4-5 N, contrôlée par le bleu de bromothymol (3) est extrêmement peu sûre. Nous avons donc déterminé expérimentalement la quantité d'ammoniaque à ajouter pour obtenir un rendement optimum. La réaction a lieu en milieu acétone (1 ml) - eau (0,5 ml). Pour env. 20 mg (78 μ moles) d'acide palmitique et 32 μ l d'AgNO₃ 80 % (147 μ moles), et après adjonction de 2,2 ml d'eau, on obtient les valeurs suivantes :

Essai	Ammoniaque ml (4,5 N) μ mole		μ mole d'ac. palmitique	μ mole de pal- mitate d'Ag	Rendement
1)	0,26	58(3/4)	78,5	27,5	35,0 %
2)	0,17	38 (1/2)	79,5	70,6	88,8 %
3)	0,09	20 (1/4)	77,1	71,7	93,0 %
4)	0,05	11(1/8)	80,2	79,5	99,1 %

Pour l'essai No 4, le changement de coloration du bleu de bromothymol est impossible à observer, seul l'essai No 1 (rendement = 35 %) étant accompagné d'un virage perceptible de l'indicateur.

Enfin, cette méthode de décarboxylations oxydatives multiples a la réputation de ne pas être strictement spécifique pour le carbone No 1 de l'acide gras considéré (12, 3), mais de provoquer également et simultanément une certaine oxydation du No 2 en CO₂. Nous avons donc effectué les 6 essais suivants de décarboxylation d'un stéarate d'argent-2-¹⁴C (2955 dpm/ μ mole) :

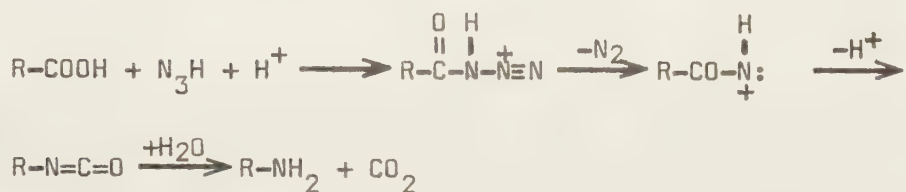
1)	30,1 dpm/ μ eq dans le CO ₂	(1,02 %)
2)	30,4 " " "	(1,03 %)
3)	41,3 " " "	(1,40 %)
4)	30,3 " " "	(1,02 %)
5)	26,4 " " "	(0,89 %)
6)	28,0 " " "	(0,95 %)

Dans les conditions que nous utilisons, la contamination par le carbone No 2 est donc très proche de 1 % (moyenne des valeurs : 1,05 %).

2.5.2. Décarboxylation simple.

2.5.2.1. Introduction.

Il s'agit de la réaction de SCHMIDT (13) :



La méthode originale (14) a été considérablement modifiée et adaptée pour de plus petites quantités (5 mg) et pour la mesure directe de la radioactivité par scintillation liquide (15, 16).

2.5.2.2. Matériel (cf. fig. 4) et réactifs.

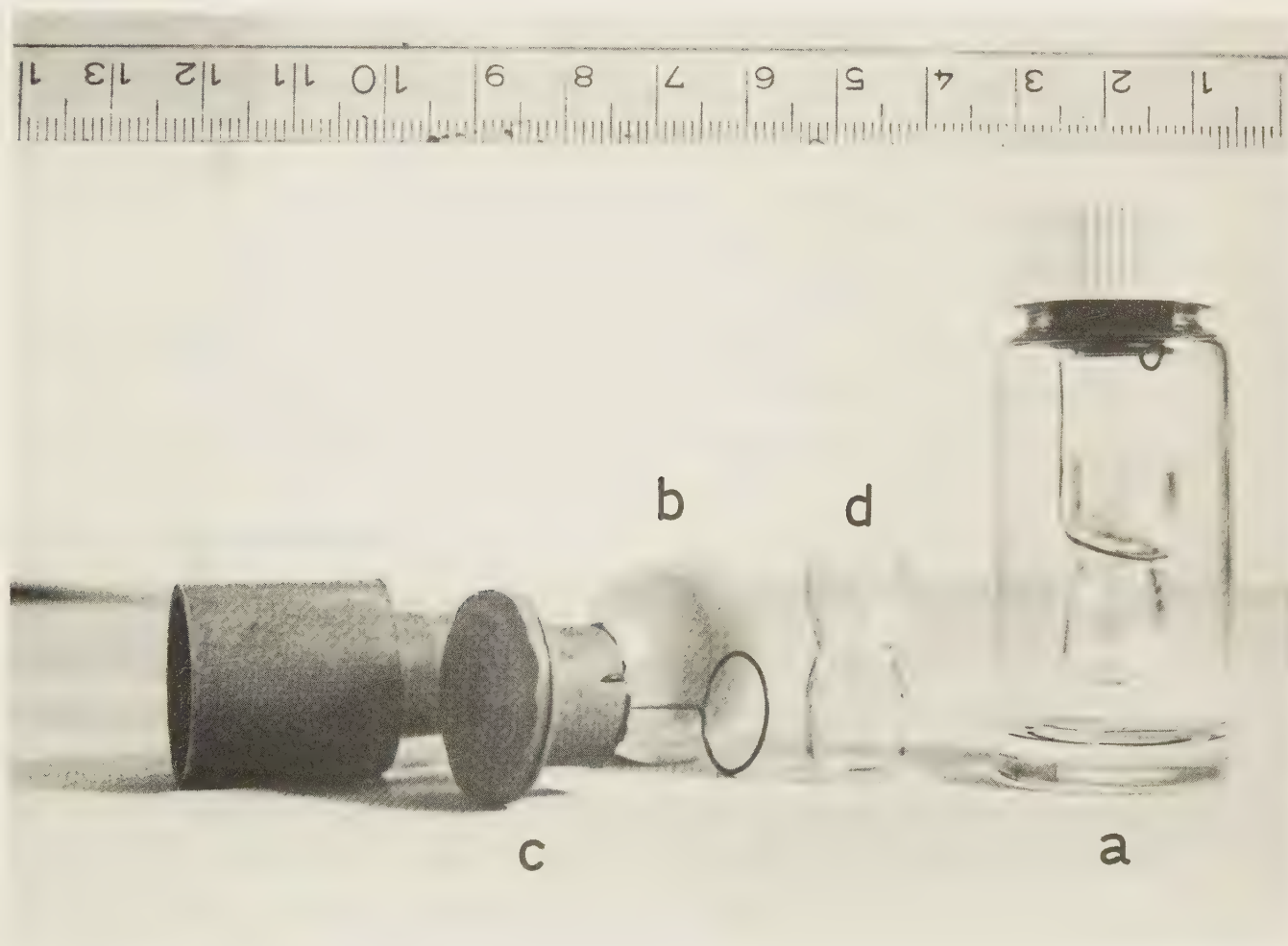
- flacons pour la scintillation liquide (a)
- bouchons d'origine pour (a), percés d'un trou de 5 mm et dont on enlève le joint (b)
- bouchons réversibles en caoutchouc (Lonstroff S.A., Carouge) munis d'un porte-nacelle en fil de fer galvanisé, collerette coupée à ras aux ciseaux (c)
- nacelles en Pyrex (volume intérieur 1,5 à 2 ml) selon (d)
- seringue en verre de 1 ml à graduation par 1/100 ml, avec aiguille
- azide de sodium NaN_3 MERCK réf. 6688
- acide sulfurique "pro anal" MERCK à 95-97 % réf. 731
- oléum 20 % (soit H_2SO_4 contenant 20 % d'anhydride SO_3)
RIEDEL DE HAEN (Hannover) "pro anal" réf. 307 36
- "Soluène NR 100" PACKARD (composé à ion ammonium quaternaire, en solution dans le toluène, voir 2.6.2.)
- KOH N titrisol, burette de 50 ml, phénolphtaléine.

2.5.2.3. Essais préliminaires.

Les auteurs précédents (15, 16) préconisent un mélange de 3 volumes d'acide sulfurique pour un volume d'oléum à 20 % de SO_3 .

Figure 4

Matériel pour décarboxylation simple (2.5.2., p. 12)



Etant donné l'hydratation très rapide de ces substances, il y a lieu cependant de déterminer expérimentalement avant chaque série de décarboxylations la concentration du mélange que l'on s'apprête à utiliser.

On prépare donc dans un cylindre gradué à bouchon rodé un mélange 75 % - 25 % comme ci-dessus. On ouvre le cylindre juste le temps nécessaire à 3 prélèvements de 1,00 ml (seringue sans aiguille, le mélange est trop visqueux pour être pipeté avec précision), chaque prélèvement étant vidé dans un erlenmeyer de 100 ml contenant déjà environ 10 ml d'eau distillée. On titre KOH N et phénolphthaléine et calcule la concentration théorique moyenne en H_2SO_4 .

Si le résultat est compris entre 96 et 100 % (c'est en général le cas avec des réactifs frais), le mélange peut être utilisé sans autre. Le rendement de décarboxylation sera égal ou supérieur à 99 %.

Si la concentration en H_2SO_4 du mélange se situe en-dessous de 96 %, il y a lieu d'en préparer une nouvelle fois en augmentant la proportion d'oléum. Dans la pratique, on constate que le simple fait d'ouvrir une bouteille d'acide sulfurique (ou d'oléum) et d'en pipeter quelques ml peut se traduire par une baisse de concentration en H_2SO_4 de l'ordre de 1 %, due à l'hydratation.

2.5.2.4. Décarboxylations.

- Dans la nacelle (d, fig. 4), peser 4 à 6 mg ($\pm$ 0,002 mg) d'acide gras et 20 à 30 mg de NaN_3 .
- Pipeter au fond du flacon (a) 1,5 ml de "soluène" (attention : certains flacons sont inutilisables : tester l'étanchéité du système (abc, fig. 4) avant l'usage).
- Assembler le bouchon (b), le caoutchouc porte-nacelle (c) et la nacelle (d); visser (bcd) sur le flacon (a) en serrant fortement par plusieurs mouvements de va-et-vient.
- Opération à effectuer avec gants et lunettes de protection : au moyen de la seringue, introduire à travers le caoutchouc (c) dans la nacelle (d) 0,28 à 0,35 ml du mélange à 96-100 % d' H_2SO_4 . Se méfier des contre-pressions (ne pas lâcher le piston).
- Temps "T" : mélanger le contenu de la nacelle et mettre le flacon à l'étuve à 65° C (mélanger : incliner le flacon à 45° et lui faire décrire 1 à 2 tours sur son axe).

- Temps T + 20 min et T + 40 min : mélanger.
- Temps T + 60 min : mélanger et mettre le flacon au réfrigérateur (3-5° C).
- Temps T + 80 min et T + 100 min : mélanger.
- Temps T + 120 min : dévisser (bcd), ajouter dans (a) 15 ml de mélange scintillant au toluène, en rinçant le fond de la nacelle (d) qui est en général humecté de "soluène".
- Déterminer la radioactivité en ^{14}C (2.6.2.).

2.5.2.5. Contrôle de la méthode.

Pour établir la validité de cette méthode, les essais techniques suivants ont été effectués, au moyen d'acide palmitique 1- ^{14}C (888 $\pm$ 2 dpm/mg) et d'acide stéarique 2- ^{14}C (777 $\pm$ 2 dpm/mg) :

	Palmitique 1- ^{14}C					Stéarique 2- ^{14}C		
	1)	2)	3)	4)	5)	1)	2)	3)
Concentration de H_2SO_4 (%)	95,0	95,0	95,0	95,8	95,8	95,8	95,8	95,8
^{14}C dans le CO_2 (%)	96,8	97,5	100	99,8	99,3	1,9	1,2	1,0

Les 1 à 2 % retrouvés avec le stéarique 2- ^{14}C ne sont en général pas gênants. Cependant, si l'on s'attend à une activité relativement forte du carbone n° 2 de l'acide gras naturel, il est préférable d'effectuer des essais parallèles avec un acide gras de synthèse marqué au ^{14}C en position 2. Il est en effet probable que cette contamination de 1 à 2 % augmente lorsque la concentration en H_2SO_4 dépasse trop 96 %.

2.6. Mesure de la radioactivité.

Toutes ces mesures ont été faites avec un spectromètre à scintillation liquide à 3 canaux Packard Instruments "Tri-Carb" n° 3003. Les échantillons sont dissous dans des flacons en verre par 15 ml

de "mélange scintillant toluène" contenant, par litre de toluène p.a. Merck réf. 8325, 5 g de "PP0" (= 2,5-diphenyloxazole) Packard réf. 6002023, et 300 mg de "POPOP" (= 1,4-bis-[2-(4-méthyl-5-phenyloxazolyl)]-benzene) Packard, réf. 6002092. Ce mélange n'a été abandonné que dans le cas de la mesure du ^{14}C du glucose ("mélange dioxane", voir § 2.7.).

Chaque échantillon a été mesuré 3 fois 10 minutes et le total des coups enregistrés divisé par 30 pour obtenir des coups par minute (cpm) avant le calcul des désintégrations par minute (dpm). Dans les cas où deux des trois mesures de 10 minutes présentaient une différence relative supérieure à 5 %, et dans tous les cas pour les activités inférieures à 500 cpm, il a été procédé à un nombre de mesures suffisant pour que la déviation standard des cpm soit inférieure à 3 %, ou pour permettre de constater une éventuelle augmentation ou diminution systématique des cpm au cours du temps, et d'y remédier.

Certains des échantillons particulièrement peu marqués ont été mesurés une ou plusieurs fois 100 minutes, mais la suroccupation chronique du seul spectromètre à scintillation disponible à l'époque interdisait le plus souvent cette manière de procéder.

2.6.1. ^3H et ^{14}C des acides gras.

Ces mesures en double marquage ont été effectuées par la méthode de Hendler (17). Cette méthode présente la particularité de placer la limite supérieure de la fenêtre d'énergie réservée au ^3H (1er canal) à l'endroit précis où toute élévation de cette limite provoquerait une augmentation plus rapide de la contamination en ^{14}C que du rendement en ^3H (pour un échantillon non-"quenché"). Le canal n°2 de l'appareil est réglé de façon à enregistrer les désintégrations du ^{14}C . Comme cet isotope émet un rayonnement β plus énergétique que celui du ^3H , il est facile de régler la limite inférieure du canal 2 suffisamment haut pour que ce canal soit incapable de capter un signal produit par les particules β du ^3H . Le troisième canal enfin recouvre, en gros, le tiers inférieur du canal n°2. Le pourcentage d'impulsions du ^{14}C qu'il enregistre effectivement par rapport au canal 2 permet

une mesure indirecte du "quenching", c'est-à-dire du déplacement apparent des courbes caractéristiques du ^{14}C et du ^3H (nombre de désintégration pour chaque énergie en fonction de l'énergie) lorsque des substances colorées ou des corps chimiques étrangers se trouvent dans la solution de scintillation et affaiblissent l'éclat lumineux des éclairs produits par fluorescence à partir de l'émission de particules β . Des tabelles établies expérimentalement donnent, pour chaque "quenching", les rendements en ^3H et ^{14}C dans leurs canaux respectifs ainsi que la contamination en ^{14}C dans le canal du ^3H .

Avec notre appareil, cela se traduit par :

Canal 1 : "fenêtre" 50 à 230 V, gain 48 %

Canal 2 : "fenêtre" 200 à 1000 V, gain 9 %

Canal 3 : "fenêtre" 200 à 322 V, gain 9 %.

Pour un rapport cpm (canal 3)/cpm (canal 2) ("quenching") variant entre 0,25 et 0,60, on a :

- rendement en ^3H dans le canal 1 : entre 17,8 et 12,9 %
- contamination en ^{14}C dans le canal 1 : entre 7,8 et 29,1 % du nombre de cpm enregistré dans le canal 2
- rendement en ^{14}C dans le canal 2 : entre 60,5 et 31,0 %.

2.6.2. Mesure de la radioactivité du $^{14}\text{CO}_2$.

Nous avons testé, puis abandonné, deux méthodes de mesure du $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ (obtenu par précipitation du $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$ résultant de l'absorption du $^{14}\text{CO}_2$ dans KOH 3 ou 5 %) : mesure directe dans un compteur de Geiger-Müller "tracerlab", ou sous forme de suspension stabilisée par un gel "carbosil" dans le mélange scintillant toluène.

La méthode finalement choisie consiste à absorber le $^{14}\text{CO}_2$ dans du "soluène" ^{NR}100" Packard (molécule dont la structure n'est pas divulguée par le fabricant, probablement un ou plusieurs noyaux mono- ou polycycliques avec une ou plusieurs fonctions ammonium quaternaire; fourni en solution de concentration inconnue dans le toluène).

Afin de déterminer la capacité pratique du "soluène" à absorber le CO_2 , nous avons effectué 7 essais avec 20 mg de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ ($=1,014 \cdot 10^{-4}$ mole). L'absorption a été réalisée par 0,05 à 1 ml de "soluène", en

utilisant le dispositif présenté à la fig. 4 (2.5.2.2.), à la différence près que le "soluène" occupait la nacelle (d), le BaCO_3 étant déposé au fond du flacon (a). Cette disposition, qui est celle des essais in vitro, 2.9., a été choisie parce qu'elle représente la plus défavorable des différentes variantes utilisées (2.5.2.4. et 2.8.1.). Le $^{14}\text{CO}_2$ a été libéré par 1 ml d'acide chlorhydrique 0,6 N et absorbé en 30 minutes en mélangeant de 5 en 5 minutes selon 2.5.2.4. (température : 4° C). Les résultats, présentés à la figure 5, indiquent que 0,15 ml de "soluène" environ est nécessaire pour l'absorption complète de 0,1 mmole de CO_2 . D'autre part, la radioactivité spécifique du $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ utilisé est d'environ 18700 dpm/20mg, soit 935 dpm/mg. Cette dernière valeur a en effet été confirmée à $\pm 2\%$ par les deux autres variantes.

Pour la mesure proprement dite de la radioactivité, nous avons établi une nouvelle courbe d'étalonnage donnant le rendement en fonction du "quenching", avec des agents de "quenching" chimiques. A cet effet, nous avons ajouté dans des flacons de radioactivité connue (toluène- ^{14}C) des quantités croissantes (0,05 à 1,5 ml) de "soluène" ou d'éthanol. On obtient deux courbes qui se confondent, l'effet de ces deux agents de "quenching" étant identique.

Cette courbe coïncide presque avec la droite correspondante du "quenching" coloré des acides gras (2.6.1.), avec un écart maximum de -1,2 % pour les valeurs moyennes de "quenching".

2.7. Glucose sanguin.

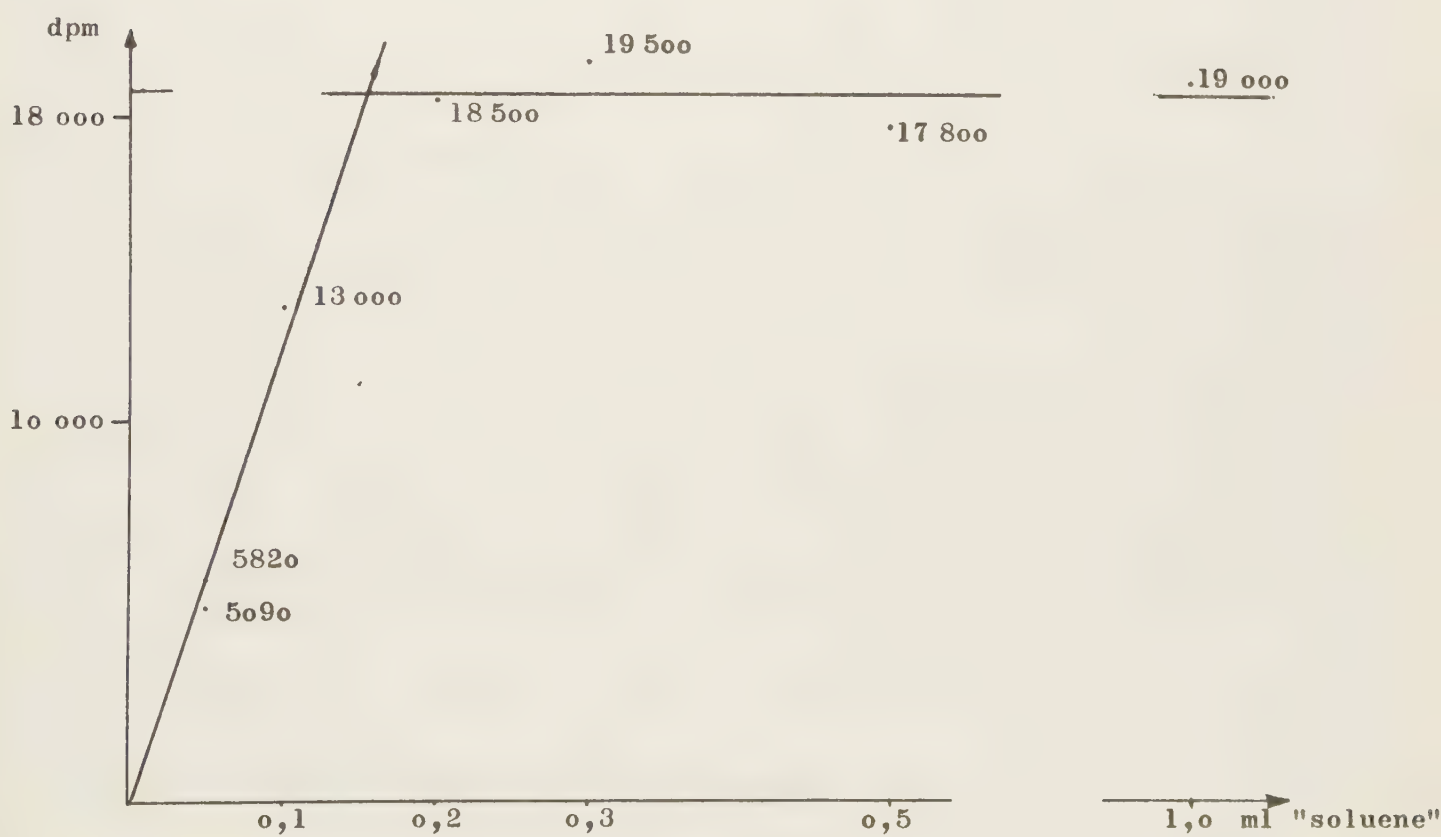
Au moment de l'exécution de la souris par décapitation, on recueille le sang dans un bécher de 100 ml contenant 20 à 40 mg de NaF. On en prélève 0,5 ml, le dilue et ajoute des quantités strictement équimoléculaires de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ et de ZnSO_4 selon la méthode de Somogyi (18) (déprotéinisation; les particules sont en outre entraînées par coprecipitation avec le BaSO_4) et centrifuge 10 minutes à 3000 trm.

Le dosage du glucose est effectué sur 0,5 ml de surnageant (surnageant total : env. 6 ml) selon une méthode à l'o-toluidine (19, 20).

On prélève également 3 ml de surnageant desquels on élimine les métabolites ionisés par passage sur un mélange de résines échangeuses

Figure 5

Absorption de 0,1014 mmole de $^{14}\text{CO}_2$ par le "soluène^{NR} 100" Packard.



d'ions (cations : DOWEX 50W,X8 et anions : DOWEX 3) (21). 0,5 ml de ce surnageant désionisé est enfin mélangé à 14,5 ml de "mélange scintillant dioxane" (pour 1 litre de dioxane Merck p.a. réf. 9671, 7 g de "PPO", 300 mg de "POPOP" (voir 2.6.) et 100 g de naphtalène Fluka purum réf. 70210).

La radioactivité en ^{14}C est ensuite mesurée au spectromètre à scintillation liquide en utilisant les mêmes réglages que ceux établis pour les acides gras et le "mélange scintillant toluène" (2.6.1.). Le rendement énergétique du "mélange scintillant dioxane" étant très inférieur à celui du "mélange toluène", une éventuelle contamination en ^3H dans le canal réservé au ^{14}C n'est donc pas à craindre.

Le rendement est mesuré en ajoutant un étalon interne (toluène- ^{14}C) à quelques flacons de comptage. Il varie très peu pour des flacons dont le "quenching" est stable à $\pm 3,5\%$ de la valeur moyenne.

Le résultat peut être exprimé soit par mg de glucose, soit par ml de sang, mais il est impossible par cette méthode de connaître l'activité totale du glucose circulant, puisque le volume total de sang ou la masse totale de glucose sanguin de chaque souris restent inconnus.

L'écart standard (relatif) étant environ deux fois moindre pour les valeurs exprimées par mg de sang, c'est celles-ci que nous avons conservées en les multipliant par 5, le glucose sanguin total d'une souris normale étant d'environ 5 mg. On peut donc considérer les résultats comme représentant la radioactivité totale du glucose sanguin.

2.8. $^{14}\text{CO}_2$.

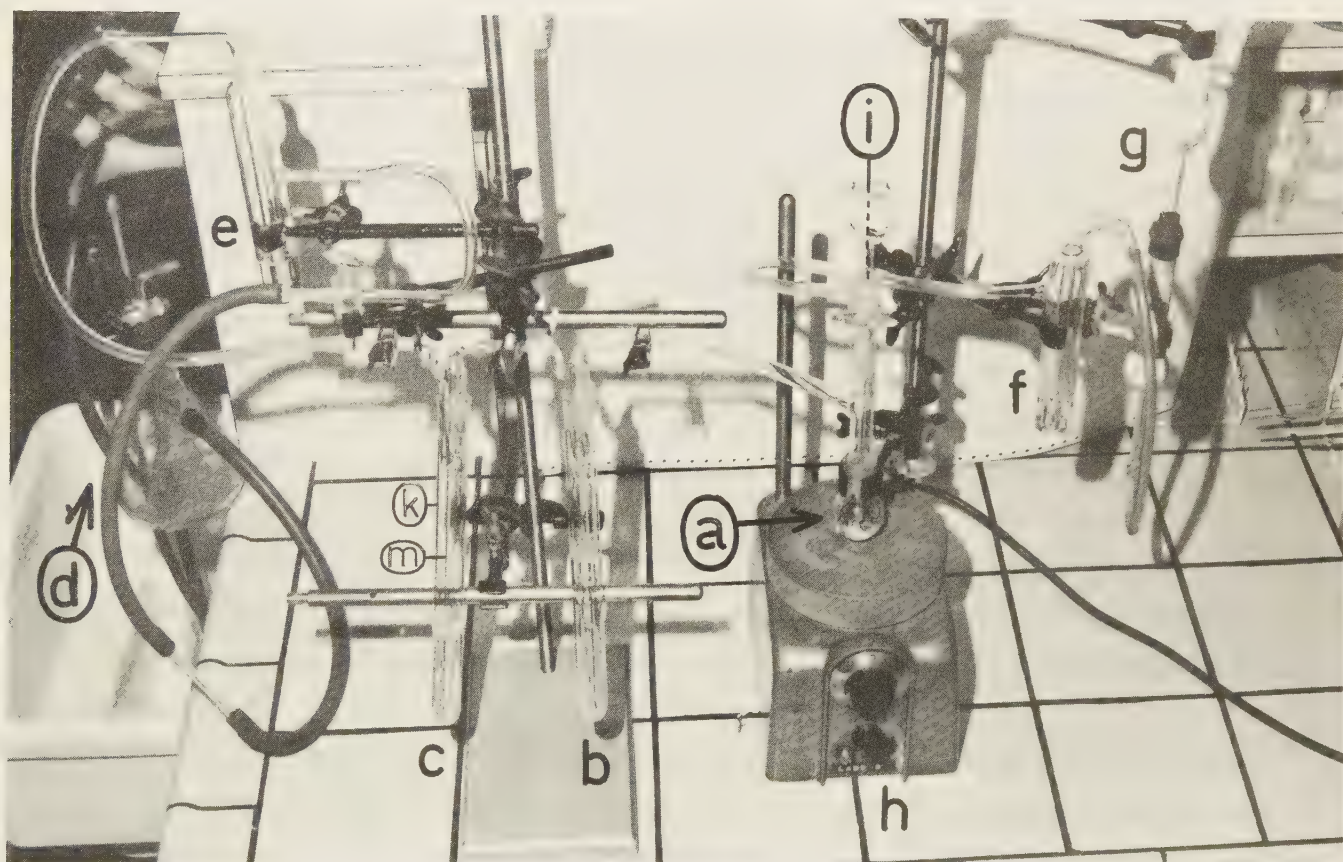
2.8.1. Libération et mesure du $^{14}\text{CO}_2$ des tissus.

Dans un ballon de 25 ml (fig. 6, a) contenant un agitateur magnétique de 1,5 cm, transférer 1 à 5 ml de la solution de saponification (phase II du § 2.2.).

L'appareil représenté à la figure 6 est celui qui était utilisé pour la décarboxylation simple (réaction de Schmidt) avant l'introduction de la microméthode décrite au § 2.5.2.; c'est également cet appareil qui permet d'effectuer la réaction n° 2 de la décarboxylation multiple (2.5.1.), ainsi que d'autres opérations telles que la com-

Figure 6

Appareil pour la libération du $^{14}\text{CO}_2$ (2.8.1, p. 18)



bustion totale d'un acide gras en CO_2 , ou sa dégradation jusqu'au groupement acétique terminal.

Le premier absorbeur (b) contient 20 à 25 ml d' H_2SO_4 2 % (l'acide acétique à 3 % dans l'eau formant un azéotrope qui distille à $76,6^\circ \text{C}$ (22) et dont il est nécessaire de stopper toute trace dans le cas de l'utilisation de l'acétate- ^{14}C comme précurseur); le deuxième absorbeur (c) 15 ml de "mélange scintillant-toluène" plus 1 ml de "soluène"^{NR} 100".

Etablir dans l'appareil au moyen de la trompe à eau (d) un courant d'air décarbonaté d'environ 20 ml/min (mesuré par le rythme de passage des bulles dans les barboteurs (e) et (f); la décarbonatation est obtenue en (g) par les trappes à chaux sodée).

Mettre le moteur de l'agitateur (h) en marche et introduire par le moyen du robinet à 3 voies (i) un large excès d'acide acétique 50 % (env. 8 N) pour libérer le CO_2 se trouvant dans la solution de saponification (a) sous forme de K_2CO_3 .

Après 30 minutes (à température ambiante), enlever rapidement le tube (k) de l'absorbeur (c) après avoir débloqué le rodage; si l'opération n'est pas assez rapide, le liquide remonte à l'intérieur de la pipe (m) et il faut l'en déloger en démontant l'appareil et en soufflant avec une poirette à l'autre extrémité. Laisser égoutter l'extérieur de la pipe 30 secondes environ dans le tube dont on transfère ensuite le contenu dans un flacon pour scintillation liquide, en laissant également égoutter 30 secondes. Etant donné la très faible tension superficielle du toluène, les pertes en liquide sont inférieures à 0,1 %. Mesurer la radioactivité (2.6.2.).

Remarques : Il est très difficile de mesurer la quantité absolue de CO_2 d'origine tissulaire, en raison de la carbonatation des solutions de KOH par le CO_2 atmosphérique. Dans certains cas, et particulièrement avec des solutions de saponification ayant séjourné sans fermeture hermétique, on peut craindre que la capacité d'absorption du "soluène" en CO_2 (0,6 à 0,7 mmoles/ml, voir 2.6.2. et fig. 5) soit dépassée. On peut le contrôler simplement en mettant deux fois plus de solution de saponification dans le ballon (a) pour certains des essais à double. Dans les conditions de notre travail cependant, les essais

avec 10 ml de solution ont toujours donné deux fois la valeur en ^{14}C de ceux à 5 ml; certaines solutions avaient pourtant séjourné pendant plus de 3 semaines dans des erlenmeyers ouverts.

Le choix de l'acide acétique est dicté par le souci d'effectuer un "washing out" dans le cas de l'utilisation d'acétate- ^{14}C comme précurseur.

Quelques tests complémentaires ont été exécutés pour garantir la validité de l'absorption en (c) (mieux que 99,9 %) et la non-persistance de $^{14}\text{CO}_2$ en amont de l'absorbeur (c) (moins de 0,5 %).

2.8.2. Mesure du $^{14}\text{CO}_2$ respiratoire.

Immédiatement après l'injection du précurseur radioactif, la souris est placée dans une "cage métabolique" (espace clos d'env. 0,7 l balayé par un courant d'air décarbonaté de 1 litre/minute, en aval duquel se trouvent deux absorbeurs à 100 ml de KOH 5 % décarbonatée).

Quelques secondes avant l'exécution, la cage est ouverte 1 à 2 secondes pour sortir la souris, puis on continue le passage de l'air pendant 10 minutes. Enfin, 20 ml de KOH sont prélevés dans chacun des deux absorbeurs; on libère le $^{14}\text{CO}_2$ dans l'appareil de la fig. 6 par 5 ml d'acide chlorhydrique 6 N et on mesure la radioactivité.

2.9. Combustion de l'acétate- ^{14}C par les mitochondries.

2.9.1. Isolement des mitochondries de foie de souris.

La méthode est celle que décrivent Johnson et Lardy (23) pour le foie de rat. Pour les points modifiés, ou non décrits par les auteurs, voici nos conditions :

Exemple : 4 foies de souris réunis, au total 6,68 g sont homogénéisés avec 25 ml de saccharose 0,25 M -EDTA 0,2 M pH 7,0. "Potter" à piston de téflon de 24 mm de diamètre, 44 mm de hauteur y compris l'extrémité hémisphérique, "clearance" env. 0,06 mm . 20 allers-retours de 10 - 15 secondes chacun à 600 trm (temps total env. 4 min). On dose ensuite la concentration en protéines de chaque fraction resuspendue, selon la méthode du biuret (24).

2.9.2. Réaction acétate- $^{14}\text{C} \longrightarrow ^{14}\text{CO}_2$.

Le milieu est celui qu'utilisent Duncombe et coll. (25) pour les mitochondries de foie de rat : milieu phosphaté contenant notamment de l'ATP et de l'AMP en quantités équimoléculaires, et une concentration en acétate de 10^{-4}M .

On place 2,5 ml de ce milieu ($\text{pH} = 7,0$) contenant 5 à 10 mg en protéines de suspension mitochondriale dans des flacons Packard, on ferme par le dispositif de la fig. 4 (2.5.2.2.), la nacelle étant vide. Au temps zéro, les flacons sont sortis de la glace et mis dans un panier en treillis métallique au bain-marie thermostatisé à 37°C . Le tout est soumis à une agitation par bielle et excentrique de 120 périodes/minute et d'amplitude de 2 cm environ.

Au temps "t", les flacons sont sortis du panier et remis dans la glace. A "t+lmin", on injecte dans le milieu 0,3 ml d'acide trichloracétique 1,4 M, puis, avant "t+30 min", 0,3 ml de "soluène^{NR}100" dans la nacelle, L'absorption du $^{14}\text{CO}_2$ est effectuée comme sous (2.6.2.).

2.10. Vérification de l'activité injectée.

Cette opération est toujours indispensable, car la radio-activité réelle des précurseurs est souvent très éloignée des allégations des fournisseurs. Elle varie, pour les préparations utilisées dans ce travail, entre 26 et 110 % de la valeur théorique.

Le plus simple est de diluer le précurseur dans l'eau (les fortes radioactivités de départ utilisées in vivo exigent le plus souvent des dilutions importantes) puis d'en dissoudre 0,5 ml dans le "mélange scintillant dioxane". Mais ce mélange est moins sûr que le "mélange toluène"; de plus, il est pratiquement inutilisable en double marquage avec notre appareil.

Pour pouvoir utiliser le "mélange scintillant toluène" sans risque de précipitation du précurseur ionisé, il faut diluer la solution aqueuse de précurseur dans l'éthanol (azéotropique), et introduire 0,1 ml de cette solution alcoolique dans le flacon à scintillation contenant déjà 14,5 ml de mélange scintillant. La solution se trouble et devient moussante. Ajouter alors de l'alcool absolu, par portions

de 0,1 ml, en mélangeant chaque fois. Après 0,3 à 0,5 ml, le trouble disparaît. Ajouter encore 0,2 ml d'alcool absolu : le toluène ne mousse plus. Mesurer la radioactivité en calculant le rendement d'après la courbe de "quenching" chimique établie expérimentalement (2.6.2.) (cette courbe est utilisable jusqu'à 1,3-1,5 ml d'alcool).

On constate parfois une baisse des cpm en fonction du temps (précipitation du précurseur ou séparation d'eau). Il est alors nécessaire d'ajouter 0,3 ml d'alcool absolu et de recommencer le comptage.

Cette mesure dans le toluène nécessite une activité spécifique d'au moins 10^6 dpm/ μ mole.

3. R E S U L T A T S

(et discussion préliminaire)

3.1. Introduction.

Pour les expériences se rapportant aux souris 1 à 17, la radioactivité est exprimée en désintégrations par minute (dpm) par μ curie injecté ($1 \mu\text{C} = 2,22 \cdot 10^6$ dpm) et par micromole (μmole) ou microéquivalent (μeq) de métabolite concerné. L'unité est donc le $\text{dpm}(\mu\text{C} \cdot \mu\text{mole})^{-1}$.

Pour les expériences se rapportant aux souris 18 et suivantes, nous avons préféré utiliser des notations strictement décimales, c'est-à-dire ramener les résultats à 10^6 dpm injectés. L'unité ainsi obtenue est notée "dpm ppm" (désintégrations par minute en partie par million). Pour alléger l'écriture de certains tableaux, nous avons également utilisé le % d'activité retrouvée (soit 10^4 dpm ppm).

Dans tous les cas, l'activité réellement injectée est indiquée.

3.2. Répartition du ^{14}C de l'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$ dans les C pairs et impairs des acides gras. (souris 1 et 3)

Théoriquement, l'atome de carbone n°1 de l'acétate ne peut être que transformé en CO_2 , ou incorporé dans les positions impaires, exclusivement, des acides gras. Une partie des conclusions de ce travail s'appuie d'ailleurs sur le fait que cette incorporation dans les positions paires de l'acide gras est nulle ou infime.

Pourtant, la publication de Dauben (2) évoquée dans l'introduction, semble infirmer cette théorie : en effet, les auteurs, ayant effectué des décarboxylations successives des quatre premiers carbones de l'acide palmitique biosynthétisé à partir d'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$ retrouvent, pour chaque élément dicarboné concerné, entre 8,3 et 13 % de la radioactivité dans l'atome pair.

Pour trancher la question, nous avons mesuré la radioactivité des deux premiers atomes de carbone de l'acide palmitique obtenu par saponification de la carcasse de souris après l'injection d'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$:

Souris n°1 : Poids = 40 g, alimentation normale, injecté env. 50 μC (1,25 μmole) d'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$, exécutée à 3 min. et entièrement saponifiée.

Souris n° 3 : Poids = 33 g, ♀ 38 jours, alimentation normale, injecté env. 20 μC d'acétate 1- ^{14}C (plus 152 μC d'acétate 2- ^3H), exécutée après 3 min. et saponifiée après ablation du foie.

Toutes les valeurs sont ramenées à 1 μC ($2,22 \cdot 10^6$ dpm) injecté.

	(Souris 1)	(Souris 3)
- Acides gras totaux :	2598 mg 271 000 dpm (12,2 %)	3259 mg 287 000 dpm (12,9 %)
- acide palmitique:	- 201 dpm/mg 51,8 dpm/ μmole	603 mg 211 dpm/mg (tot. : 127 000 dpm ou 5,7%) 54,0 dpm/ μmole
- élément dicarboné moyen :	51,8 : 8 = 6,48 dpm/ μeq	54,0 : 8 = 6,75 dpm/ μeq
- carbone n°1 :	6,94 dpm/ μeq	7,32 5,32 moy. 6,3 dpm/ μeq
- carbone n°2 :	0,056 0,032 moy. 0,044 dpm/ μeq	0,121 dpm/ μeq
- % (C_2/C_1)	0,63 % (*)	1,9 %

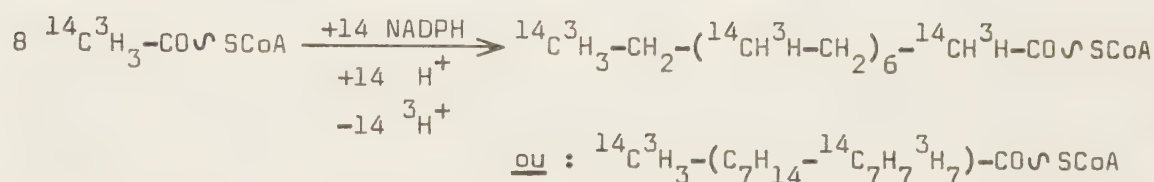
(*) en fait, il aurait fallu écrire "inférieur à 1 %", ce résultat étant obtenu à partir de mesures de radio-activité à peine supérieures au "bruit de fond".

Etant donné la contamination de 1 % du carbone n° 3 dans le n° 2 (voir 2.5.1., essais techniques avec l'acide stéarique 2- ^{14}C), on peut conclure que la radioactivité du carbone n° 2 de l'acide palmitique

de carcasse de souris, synthétisé in vivo à 3 minutes à partir d'acétate $1-^{14}\text{C}$, est comprise entre 0 et 1 % de celle du carbone $n^{\circ} 1$.

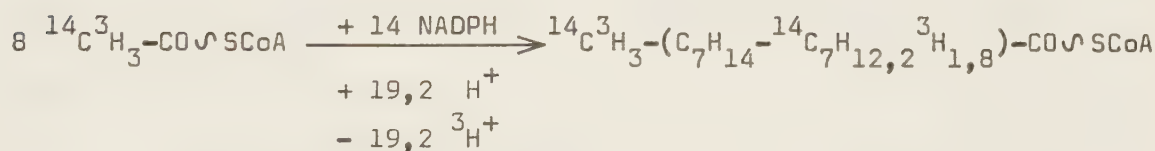
3.3. Utilisation de l'hydrogène de l'acétate dans la synthèse des acides gras.

En 1962, Foster et Bloom (26), travaillant sur des coupes de foie de rat, constatent que la synthèse de l'acide palmitique à partir de $^{14}\text{C}^3\text{H}_3-\text{COO}^-$ est accompagnée d'une perte en ^3H beaucoup plus importante que ne laisserait supposer l'équation théorique suivante :



Pour un rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ du substrat égal à 1, ce schéma de synthèse devrait conduire à un acide palmitique dont le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ serait égal à $(10/3)/8 = 0,417$ ($10/3$ car les 10 ^3H ne doivent être comptés que pour $1/3$, puisque le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ du substrat égale 1 et non point 3).

Le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ moyen observé par Foster et Bloom n'est que de 0,200 ce qui, après calcul, donne l'équation pratique suivante :



Le tritium méthylique en position 16 ($^{14}\text{C}^3\text{H}_3-\dots$) est en effet intégralement conservé (27).

Quant à la fraction de ^3H méthylénique conservé par un élément dicarboné quelconque des positions 1 à 14, elle est de $1,8/7 = 0,257$ (25,7 %) par rapport au ^3H de l'équation théorique ou de $1,8/21 = 0,086$ (8,6 %) par rapport au ^3H du substrat. Cette dernière valeur représente le rendement en ^3H du mécanisme de synthèse par condensation.

Il est cependant à noter que ce résultat est obtenu après un temps d'incubation de 2 heures, et que, in vivo, la synthèse des

acides gras à partir d'acétate cesse d'augmenter après 3 minutes déjà, du moins chez la souris (8).

En 1966, Rous (28) effectue un travail similaire, mais précisément sur la souris vivante. Dans ce cas, la fraction de ^3H conservée par les méthylènes 1 à 14 de l'acide palmitique est supérieure à celle observée par Foster et Bloom, dans le foie à 3 minutes déjà, mais surtout dans le foie à 30 minutes et dans la carcasse à 3 minutes. Quant aux résultats parallèles obtenus par Rous sur l'acide stéarique, ils sont difficiles à interpréter pour la raison suivante :

Contrairement à l'acide palmitique, l'acide stéarique ne résulte pas d'une incorporation plus ou moins équivalente de l'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$ injecté dans les différents éléments dicarbonés, mais son atome de carbone No 1 est plus fortement marqué que les autres atomes impairs des positions 3 à 17 (29). En effet, sa synthèse se produit surtout par adjonction d'un acétyl-CoA à un palmityl-CoA préexistant (procédé dit d'élongation).

Nous avons donc effectué des essais de synthèse des acides gras in vivo à partir d'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$, $2\text{-}^3\text{H}$, en décarboxylant les acides gras individuels, afin de pouvoir également calculer la fraction de ^3H conservé lors de la synthèse par élongation aboutissant à l'acide stéarique.

3.3.1. Incorporation de $\text{C}^3\text{H}_3\text{-}^{14}\text{COO}^-$ dans les acides gras après 3 minutes (série préliminaire).

(Souris 2 à 5 : ♀ 38 jours, 33 à 37 g).

Déroulement de l'expérience : Les animaux sont séparés 24 h avant l'injection ($t - 24\text{ h}$), les souris 4 et 5 étant mises à jeun (eau à volonté). Au temps " t ", les souris reçoivent, par injection intraveineuse, de l'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$, $2\text{-}^3\text{H}$ (moins de $15\text{ }\mu\text{mole}$) en solution dans $0,3\text{ ml}$ de $\text{NaCl } 0,9\%$ selon le schéma suivant :

- souris 2 et 3 : $20\text{ }\mu\text{C}$ de ^{14}C et $152\text{ }\mu\text{C}$ de ^3H
- souris 4 et 5 : $200\text{ }\mu\text{C}$ de ^{14}C et $760\text{ }\mu\text{C}$ de ^3H .

A " $t + 3\text{ minutes}$ ", les souris sont sacrifiées et saponifiées après ablation du foie(2.1.).

Le tableau 1 donne les désintégrations par minute de ^{14}C et de ^3H , ramenées à une dose de précurseur théorique de $1\text{ }\mu\text{C}$ pour chaque

Tableau 1

Précurseur : $C^3H_3 \text{ } ^{14}COO^-$

Synthèse des acides gras totaux (T), palmitique (P) et stéarique (S) dans la carcasse des souris 2 à 5, trois minutes après l'injection du précurseur.

Acide gras * (mg)	^{14}C de tout l'acide **	$^{14}COOH$ **	Rapport d'élon- gation *** (a)	3H **	$^3H/^{14}C$ ***	$^3H/^{14}C$ posit. 1-2 *** (a)
T ₂ (2510)	30,4			8,72	0,287	
T ⁿ ₃ (3259)	24,12			7,02	0,291	
T ₄ (1538)	8,72			2,22	0,255	
T ^j ₅ (1912)	8,91			2,29	0,257	
P ₂ (441)	73,2	9,14	1,00	21,65	0,296	0,195
P ⁿ ₃ (603)	54,0	6,45	0,95	16,00	0,296	0,143
P ₄ (289)	10,70	1,223	0,91	3,33	0,311	0,209
P ^j ₅ (271)	11,32	1,440	1,02	3,47	0,307	0,208
S ₂ (110)	41,85	9,03	2,20	9,72	0,232	0,001
S ⁿ ₃ (142)	36,80	8,48	2,39	8,44	0,230	0,007
S ₄ (122)	18,17	6,99	5,01	3,28	0,181	-0,029
S ^j ₅ (117)	19,40	5,95	3,53	3,52	0,181	-0,103

Légende :

* 2, 3, 4 et 5 = souris 2, 3, 4, 5
n = alimentation normale
j = à jeun

** Unité = $dpm \cdot \mu C^{-1} \cdot \mu mole^{-1}$ (ou μeq^{-1})

*** Sans unité (rapport)

(a) Exemple de calcul et explication :
voir texte (3.3.1.) p. 27-28.

isotope. Les résultats sont en outre exprimés par μ mole d'acide gras (ou par μ équivalent, μ eq, pour le $^{14}\text{C}\text{OOH}$), le calcul étant basé, pour les acides gras totaux, sur un poids moléculaire de 274. Ce chiffre représente une moyenne tenant compte de la répartition des acides gras individuels les plus importants (oléique, palmitique et stéarique) dans les acides gras totaux.

Le rapport d'élongation représente le rapport du $^{14}\text{C}\text{OOH}$ (carboxyle) sur la moyenne des autres ^{14}C impairs de l'acide gras. Exemple pour S 2 : $41,85 \text{ dpm} - 9,03 \text{ dpm} = 32,82 \text{ dpm}$ (^{14}C positions 3 - 18); $32,82 \text{ dpm} : 8 = 4,10 \text{ dpm}$ (^{14}C positions 3, 5, 7...15 ou 17); et enfin : $9,03 \text{ dpm} : 4,10 \text{ dpm} = 2,20 = \text{rapport d'élongation}$.

Le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ en position 1 - 2, dernière colonne du tableau 1, a été calculé de la manière suivante :

Pour l'acide palmitique, on soustrait de l'activité en ^3H le $1/8$ de l'activité en ^{14}C (à cause de l'élément 15 - 16 dont le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ est de 1). Le résultat représente le ^3H des positions 1 à 14; il est divisé par les $7/8$ de l'activité en ^{14}C . Le rapport obtenu concerne donc un élément dicarbone moyen des positions 1 à 14, et pas particulièrement l'élément des positions 1 - 2. Exemple pour P 2 : $73,2 \text{ dpm} : 8 = 9,15 \text{ dpm}$ (radioactivité du carbone 1, ou 3, ou 5 ... ou 15; c'est donc aussi la radioactivité du ^3H en position 16, puisque, comme l'a démontré Marcus et coll (27), cette position conserve tout son ^3H). $21,65 \text{ dpm} - 9,15 \text{ dpm} = 12,50 \text{ dpm}$ (radioactivité en ^3H des positions 2 à 14, à l'exclusion de la position 16). $12,50 \text{ dpm} : (7/8) 73,2 \text{ dpm} = \underline{0,195}$.

Pour l'acide stéarique, on soustrait de l'activité en ^{14}C de l'acide complet l'activité du carboxyle (pour connaître l'activité en ^{14}C du palmityl - CoA ayant servi à l'élongation). Le résultat de cette soustraction est multiplié par le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ de l'acide palmitique du même animal (cette opération donne l'activité en ^3H du segment 3 à 18 de l'acide stéarique). Ce dernier résultat est soustrait de l'activité en ^3H de l'acide complet. On a maintenant l'activité en ^3H de la position 2 de l'acide stéarique, qu'il suffit de diviser par l'activité (en ^{14}C) du carboxyle pour obtenir le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ de l'élément 1-2. Exemple pour S 3 :

$36,80 \text{ dpm} - 8,48 \text{ dpm} = 28,32 \text{ dpm}$ (radioactivité en ^{14}C du segment 3 - 18). $28,32 \text{ dpm} \cdot 0,296 = 8,38 \text{ dpm}$ (radioactivité en ^3H du même segment 3 - 18, ou radioactivité en ^3H du palmityl-CoA ayant servi à l'élongation).

$8,44 \text{ dpm} - 8,38 \text{ dpm} = 0,06 \text{ dpm}$ (^3H en position 2 du stéarique).

$0,06 \text{ dpm} : 8,48 \text{ dpm} = \underline{0,007}$.

Il est à noter qu'un calcul de ce type donne un résultat très approximatif à cause de la soustraction entre deux chiffres très voisins (8,44 dpm et 8,38 dpm; l'erreur sur chacun d'eux est d'environ $\pm 0,3 \text{ dpm}$). De plus, les postulats admis pour le calcul (en particulier l'homogénéité de marquage des positions 3 à 16) ne sont sans doute pas tous exacts en pratique, ce qui explique les résultats négatifs de S 4 et S 5.

3.3.2. $\text{C}^3\text{H}_7 - ^{14}\text{COO}^-$ dans les acides gras de 0,5, 0,75, 1 et 2 minutes.
(Souris 8 à 17 : ♀ 57 jours, 27 à 29 g)

Déroulement de l'expérience : Les animaux, séparés le soir précédant l'expérience (environ $t - 21 \text{ h}$) sont nourris "ad libitum" pendant la nuit et reçoivent chacun, à $t - 7 \text{ h}$, puis à $t - 4 \text{ h}$, 1 g d'aliment pour rongeurs "Nafag". Au temps "t", chaque souris reçoit, par injection intraveineuse, de l'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$, $2\text{-}^3\text{H}$ en solution dans 0,3 ml de NaCl 0,9 % (moins de $0,7 \mu\text{mole}$ d'acétate), à raison de $35 \mu\text{C}$ pour le ^{14}C et de $308 \mu\text{C}$ pour le ^3H . Les souris sont sacrifiées et saponifiées après ablation du foie selon le schéma suivant :

- Souris 8, 9, 10 et 11	:	sacrifiées au temps $t + 30$ secondes
- " 12 et 13	:	" " " $t + 45$ secondes
- " 14 et 15	:	" " " $t + 1$ minute
- " 16 et 17	:	" " " $t + 2$ minutes

Le tableau 2 donne les résultats de l'expérience, selon les mêmes critères et après les mêmes calculs que le tableau 1 (explications à 3.3.1.). La comparaison des résultats de cette expérience avec ceux des souris 2 et 3 (alimentation normale) rapportés dans le tableau 1 conduit aux constatations suivantes :

Les deux expériences ne sont pas comparables en ce qui concerne les radioactivités en ^{14}C et en ^3H ; cependant, les rapports $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ globaux ou partiels sont remarquablement semblables, de même que les rapports d'élongation de l'acide stéarique.

La moyenne pour chaque temps d'expérience donne les valeurs suivantes pour le rapport d'élongation du stéarique et la fraction de ^3H conservée par condensation ou élongation :

Tableau 2
=====

Précurseur : $C^3H_3-^{14}COO^-$

Synthèse des acides gras totaux (T), myristique (M), palmitique (P) et stéarique (S) dans la carcasse des souris 8 à 17, 0,5 à 2 minutes après l'injection du précurseur radioactif.

Acide gras (mg) *	^{14}C de tout l' acide **	$^{14}COOH$ **	Rapport d'élon- gation *** (a)	3H **	$^3H/^{14}C$ ***	$^3H/^{14}C$ posit. 1-2 ***
T 8 (776)	14,81			4,12	0,288	
T 9 (902)	32,6			9,08	0,288	
T 10 (973)	27,0			7,41	0,275	
T 11 (773)	33,8			9,38	0,278	
T 12 (623)	50,0			14,09	0,282	
T 13 (724)	43,7			12,35	0,283	
T 14 (742)	54,0			15,37	0,285	
T 15 (775)	53,5			15,00	0,281	
T 16 (978)	46,9			13,40	0,286	
T 17 (806)	45,6			12,83	0,282	
M 8 à 17 (Moyenne)	40,9			12,52	0,306	
P 8 (143)	112,2	12,98	0,917	33,4	0,297	0,197
P 9 (147)	85,8	11,58	1,090	25,2	0,293	0,193
P 10 (116)	75,7	-	-	21,35	0,282	0,180
P 11 (115)	110,7	14,30	1,038	30,95	0,280	0,177
P 12 (-)	138,3	17,4	1,008	40,6	0,293	0,174
P 13 (115)	111,6	-	-	33,1	0,297	0,197
P 14 (-)	132,8	-	-	39,0	0,294	0,193
P 15 (112)	138,4	18,45	1,076	40,5	0,293	0,192
P 16 (147)	119,1	16,30	1,111	35,8	0,301	0,201
P 17 (121)	118,2	-	-	35,3	0,299	0,198
S 8 (114)	56,1	13,11	2,440	14,18	0,253	0,107
S 9 (69)	54,4	12,71	2,435	12,87	0,237	0,052
S 10 (29)	51,2	11,20	2,240	11,84	0,231	0,050
S 11 (48)	57,3	12,83	2,306	13,22	0,231	0,029
S 12 (55)	76,2	16,26	2,168	18,73	0,248	0,073
S 13 (55)	71,6	17,15	2,525	16,95	0,237	0,046
S 14 (57)	76,9	16,22	2,138	18,61	0,242	0,046
S 15 (-)	70,8	16,08	2,352	16,00	0,226	0,000
S 16 (76)	73,6	16,27	2,270	17,17	0,233	-0,004
S 17 (47)	77,5	16,38	2,142	19,32	0,239	0,064

Légende : Voir tableau 1.

Temps d'expérience (nombre d'animaux)	Rapport d'élongation	^3H conservé par condensation	^3H conservé par élongation
30 sec (4)	2,36	0,191	0,059
45 sec (2)	2,35	0,185	0,055
1 min (2)	2,25	0,192	0,023
2 min (2)	2,20	0,200	0,030
3 min (2)*	2,30	0,208	0,004

* Série différente

Il semble donc que le procédé de synthèse des acides gras par élongation conserve entre 3 et 8 fois moins de ^3H que le procédé par condensation.

Quant à la diminution du ^3H conservé par élongation lorsque le temps de synthèse augmente, elle est assez logique puisque le mécanisme d'élongation est relativement lent. Elle indiquerait donc (a) que la quantité de ^3H conservée dépend surtout de la rapidité de l'adjonction du dernier élément dicarboné, ou bien (b) que, à temps court, une proportion relativement élevée de cet élément est ajouté au palmityl-CoA par le procédé (rapide) de condensation. Comme le rapport d'élongation varie peu en fonction du temps de synthèse, le facteur purement cinétique (a) est sans doute la raison dominante de cette diminution.

3.4. Incorporation de l'acétate 1- et 2- ^{14}C , et du pyruvate 2- et 3- ^{14}C dans les acides gras et le glucose sanguin, 3 minutes après l'injection.
(Souris 19 à 50, ♂ de 57 jours, 27,5 à 32,7 g)

Déroulement de l'expérience : Les animaux, séparés entre t - 20 et t - 22 h, sont nourris "ad libitum" jusqu'à t - 7 h 30. Ils reçoivent chacun, à t - 7 h 30, à t - 4 h et à t - 1 h 30, 1 g d'aliment pour rongeurs "Nafag". Au temps "t", le précurseur radioactif est injecté selon le schéma suivant :

- souris impaires 19 à 33, $4,93 \cdot 10^6$ dpm (= 2,22 μC) d'acétate 1- ^{14}C
- " paires 20 à 34, $4,65 \cdot 10^6$ dpm (= 2,19 μC) d'acétate 2- ^{14}C
- " impaires 35 à 49, $12,7 \cdot 10^6$ dpm (= 5,72 μC) de pyruvate 2- ^{14}C
- " paires 36 à 50, $14,3 \cdot 10^6$ dpm (= 6,44 μC) de pyruvate 3- ^{14}C

Les animaux sont sacrifiés au temps $t + 3$ minutes pour les Nos 19 à 34, et au temps $t + 15$ minutes pour les Nos 35 à 50 (15 minutes représentent le temps approximatif après lequel l'incorporation de la radioactivité du pyruvate dans les acides gras cesse d'augmenter).

Au moment de l'exécution par décapitation, le sang est recueilli, puis immédiatement déprotéinisé en vue du dosage du glucose et de la détermination de sa radioactivité (2.7., p. 17). Simultanément, l'animal est disséqué et le foie, les graisses blanches épидидymales et la carcasse sont saponifiées séparément (2.1., p. 5).

Le tableau 3 donne, en dpm ppm (voir 3.1., p. 23) ou en % la radioactivité moyenne (en ^{14}C) retrouvée dans le glucose sanguin et les acides gras totaux (= non séparés) pour les 4 précurseurs, ainsi que l'écart standard pour chaque série et la probabilité de recouvrement calculée selon la méthode de Student. Les résultats présentés sur ce tableau peuvent être interprétés de la façon suivante :

3.4.1. Calcul de la proportion de pyruvate carboxylé ou décarboxylé.

Le calcul proprement dit ne concerne que la partie du pyruvate destinée à la gluconéogénèse; pour le pyruvate total, les données à disposition n'autorisent qu'une estimation.

Si l'on ne tient pas compte des voies quantitativement secondaires, on doit considérer les deux possibilités suivantes pour obtenir du glucose ^{14}C après injection de pyruvate 2- ou 3- ^{14}C :

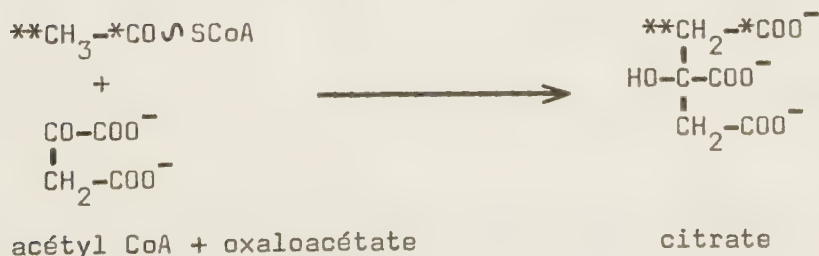
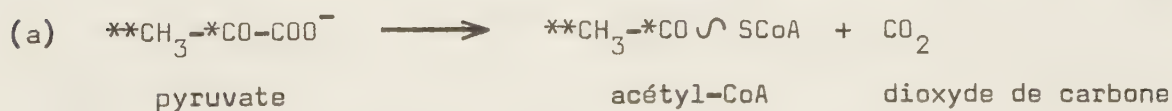


Tableau 3
=====

Souris 19 à 50 : synthèse des acides gras totaux et gluconéogénèse.

Moyennes de 6 à 8 valeurs, $\pm$ déviation standard. Probabilité de recouvrement (p) d'une valeur moyenne par rapport à la précédente calculée selon la méthode de Student,

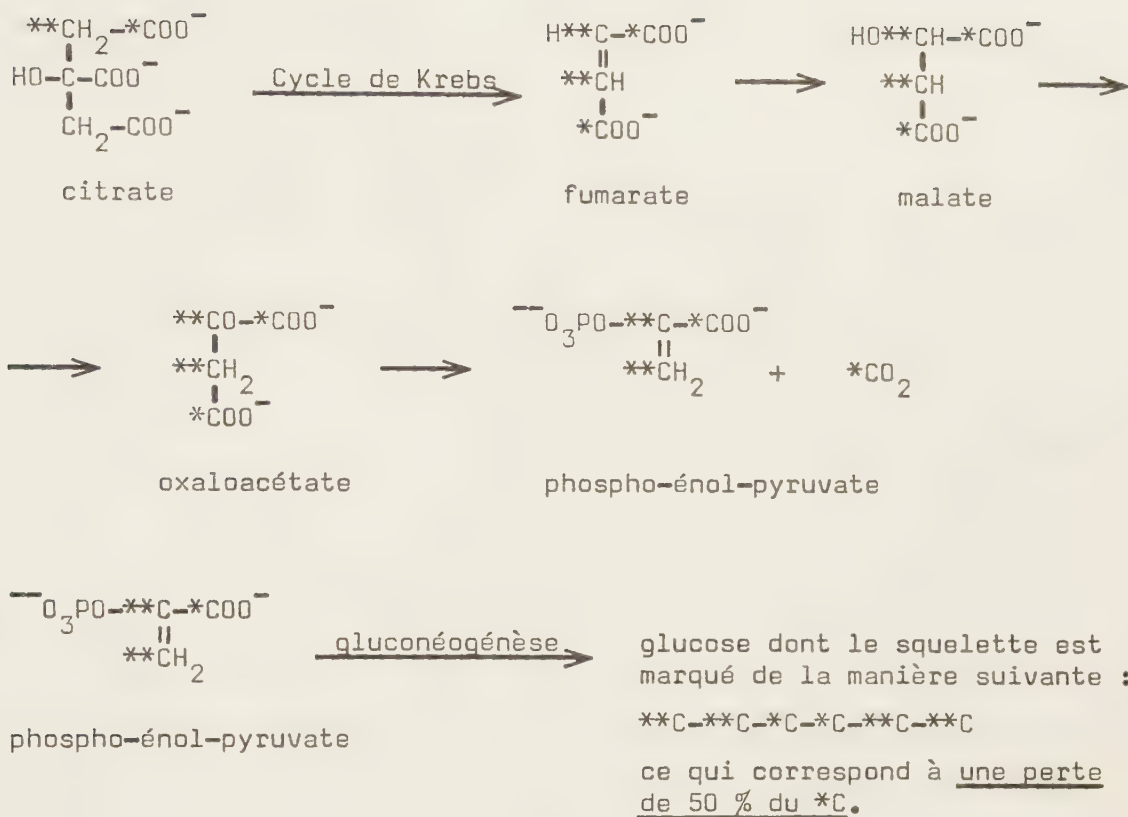
n.s. signifie que l'écart entre une valeur moyenne et la précédente n'est pas significatif ($p > 0,05$).

Précurseurs : acétate et pyruvate ^{14}C .

	Acétate $1-^{14}\text{C}$	Acétate $2-^{14}\text{C}$	Pyruvate $2-^{14}\text{C}$	Pyruvate $3-^{14}\text{C}$
Temps d'exécution (min)	3	3	15	15
Nombre d'animaux	8	8	8	8
^{14}C dans le glucose sanguin, dpm ppm	6 400 $\pm$ 1 550	13 000* $\pm$ 1 090 $p < 0,001$	8 400* $\pm$ 2 720	13 520 $\pm$ 1 680 $p < 0,001$
^{14}C dans les acides gras de la carcasse, dpm ppm	95 400* $\pm$ 5 660	99 100** $\pm$ 6 220 n.s.	65 200** $\pm$ 4 820	70 400 $\pm$ 19 400 n.s.
^{14}C dans les acides gras du foie, dpm ppm	7 980 $\pm$ 4 580	7 480 $\pm$ 4 320 n.s.	2 640 $\pm$ 1 280	2 710 $\pm$ 832 n.s.
^{14}C dans les acides gras du tissu adipeux épi- didymal, dpm ppm	1 600* $\pm$ 317	2 760* $\pm$ 565 $p < 0,001$	1 730 $\pm$ 776	1 630 $\pm$ 873 n.s.***
^{14}C des acides gras de tout l'animal, %	10,5 % $\pm$ 0,8 %	10,6 % $\pm$ 0,9 % n.s.	6,96 % $\pm$ 0,51 %	7,47 % $\pm$ 2,11 % n.s.

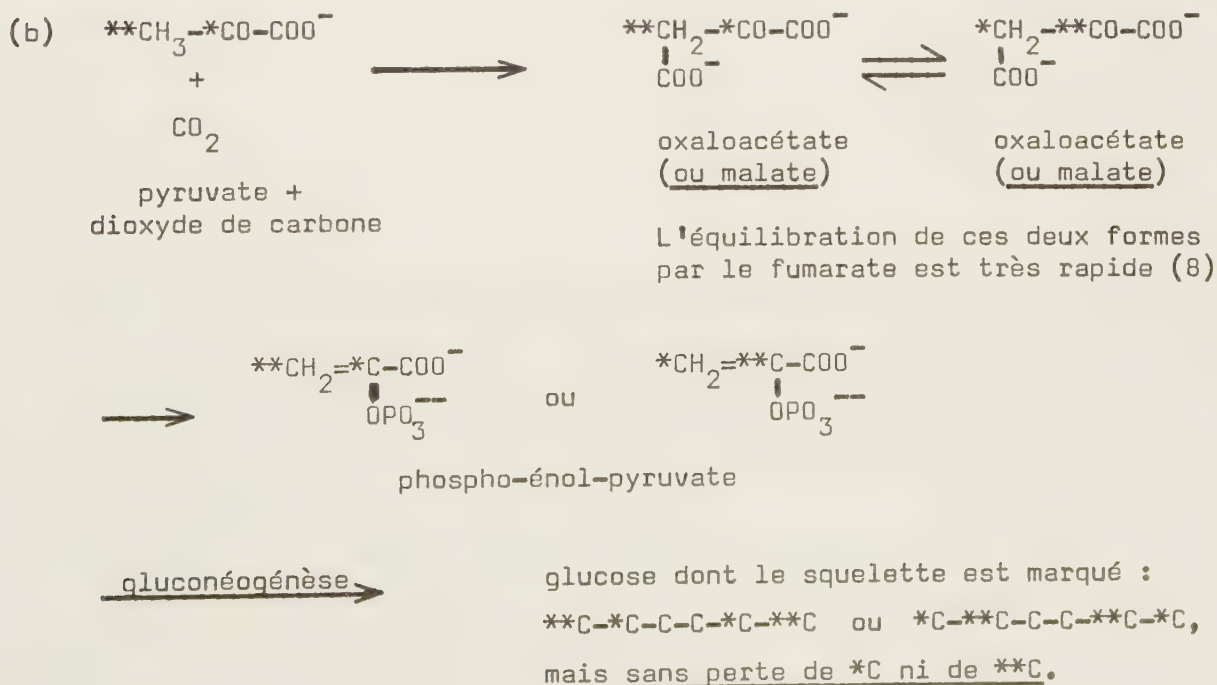
* (ou **) : une (ou deux) des 8 valeurs éliminée(s) selon le critère de Chauvenet. Ces chiffres sont tirés des sept (ou six) valeurs restantes.

*** $0,8 < p < 0,9$



Cette voie donne donc du glucose deux fois moins marqué lorsqu'elle est suivie par du pyruvate 2-¹⁴C que si c'est le pyruvate 3-¹⁴C qui est utilisé comme précurseur.

L'autre voie aboutit à un résultat différent :



Il en serait de même si l'oxaloacétate formé par la voie (b), puis condensé avec de l'acétyl CoA froid, se transformait en glucose après un tour de cycle de Krebs.

Pratiquement, on obtient (cf. tableau 3) :

$$*C \text{ du pyruvate } 2-^{14}C = 8.400 \text{ dpm ppm}$$

$$**C \text{ du pyruvate } 3-^{14}C = 13.520 \text{ dpm ppm}$$

La différence entre ces deux valeurs représente le *C qui est perdu sous forme de $*CO_2$ lors du passage par la voie (a). Comme cette perte n'est que de 50 %, nous avons pour la voie (a) :

$$2 \cdot (13.520 \text{ dpm} - 8.400 \text{ dpm}) = \underline{10.240 \text{ dpm}}$$

et pour la voie (b) :

$$13.520 \text{ dpm} - 10.240 \text{ dpm} = \underline{3.280 \text{ dpm}}$$

(24,3 % du total).

On peut donc conclure que, dans cette expérience, la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate n'est que de 24 % environ.

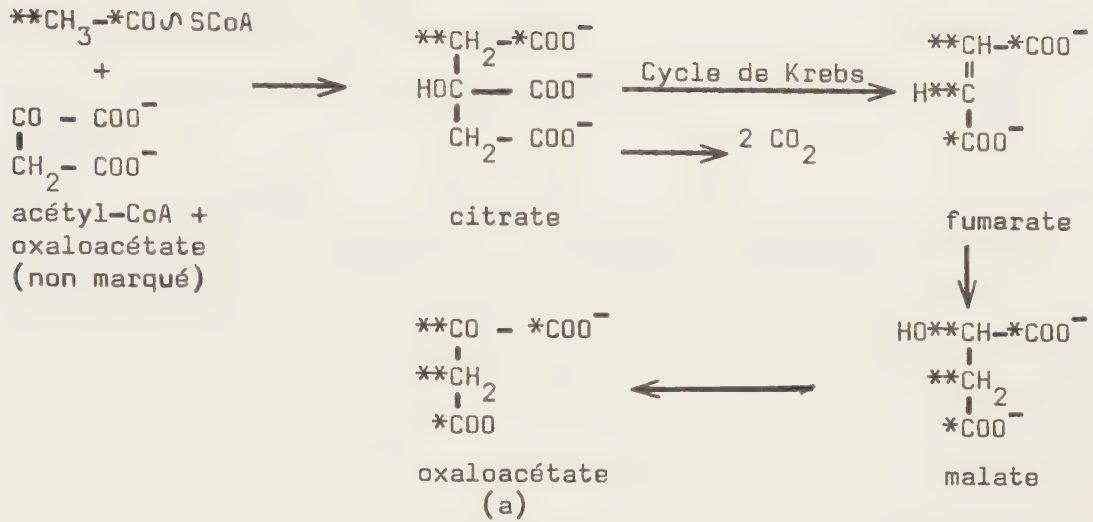
Rappelons encore que ce calcul ne concerne que le pyruvate dont les atomes de carbone sont utilisés par la suite dans la gluconéogenèse. Cette proportion n'est pas nécessairement la même pour le pyruvate destiné à la synthèse des acides gras et à la combustion par le cycle de Krebs. Nous reviendrons sur ce point dans la discussion générale, à la lumière des résultats d'une prochaine expérience (3.9.).

Enfin, il convient encore de signaler que les résultats obtenus dans cette expérience pour la gluconéogenèse à partir d'acétate 1- et 2- ^{14}C ($**CH_3-^*COO^-$) sont une preuve de plus de l'impossibilité, pour l'acétyl-CoA ou l'acétate, de se carboxyler en pyruvate : le rendement en **C (13.000 dpm ppm) est presque exactement le double de celui en *C (6.400 dpm ppm), ce qui confirme que la voie (b) n'est pas utilisable par l'acétate. Il était intéressant de l'établir aussi chez l'animal vivant.

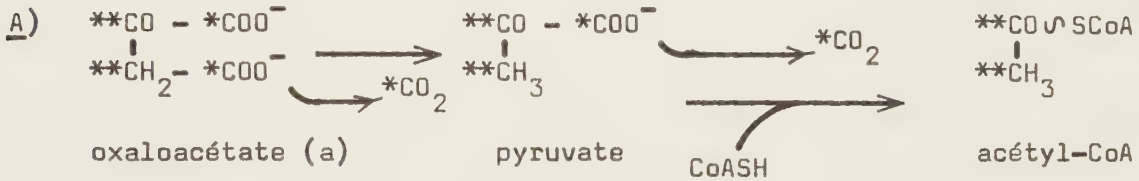
3.4.2. Passage de l'acétate par la mitochondrie avant la synthèse des acides gras.

Outre la voie directe de synthèse des acides gras (condensation ou élongation) par laquelle les ^{14}C No 1 (*C) ou No 2 (**C) de l'acétate sont tous deux utilisés avec un rendement identique, on peut imaginer la voie suivante :

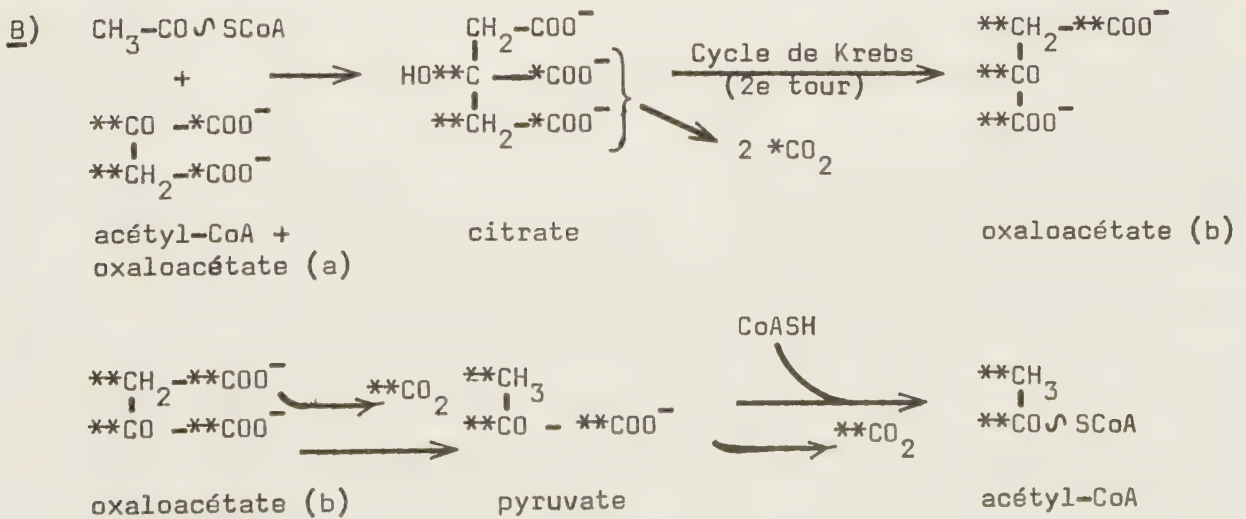




L'oxaloacétate (a) peut alors se comporter de plusieurs façons :



Cet acétyl-CoA donnera des acides gras marqués uniquement au **C, le *C étant intégralement perdu sous forme de *CO₂.



Comme pour A), on obtiendra ici des acides gras marqués exclusivement au ^{14}C , mais avec un rendement diminué de 50 %, la moitié des ^{14}C de l'oxaloacétate (a) ou (b) étant transformés en $^{14}\text{CO}_2$.

C) etc. Un troisième tour de l'oxaloacétate (b) dans le cycle de Krebs provoquerait une combustion de 75 % des ^{14}C , un quatrième tour de 87,5 %, etc. Comme on le verra plus loin (3.9.), il est possible d'estimer le nombre de tours de l'oxaloacétate dans le cycle de Krebs par la mesure du $^{14}\text{CO}_2$ tissulaire. Les résultats obtenus avec d'autres expériences (3.9. et 3.10.) permettent d'affirmer que l'acétyl-CoA 2- ^{14}C qui s'introduit dans le cycle de Krebs exécute en moyenne plusieurs tours. Par conséquent, le rendement effectif en ^{14}C doit être inférieur à 50 % lorsque la voie indirecte exposée ci-dessus est suivie.

Ces quelques explications étaient nécessaires pour permettre d'interpréter l'incorporation (significativement) plus élevée de l'acétate 2- ^{14}C par rapport à celle de l'acétate 1- ^{14}C dans les acides gras, pour le tissu adipeux épидидymal (tableau 3 : respectivement 2760 ± 565 dpm et 1600 ± 317 dpm). Il semble bien que, dans ce tissu, et dans les conditions de cette expérience, la majeure partie de l'acétyl-CoA participe au cycle de Krebs avant d'être utilisé dans les acides gras (voie indirecte). Comme plusieurs réactions de ce cycle ne peuvent avoir lieu que dans la mitochondrie, on a ainsi une preuve indirecte que plus de la moitié de l'acétate injecté passe par la mitochondrie avant d'être utilisé dans la synthèse des acides gras.

Cette affirmation n'est valable que pour le tissu adipeux épидидymal, la dispersion des résultats correspondants obtenus avec le foie et la carcasse empêchant de tirer la même conclusion sur ces tissus.

En outre, on ne constate aucune différence significative dans les résultats de l'incorporation du pyruvate 2- ou 3- ^{14}C dans les acides gras des différents tissus, ce qui est inattendu puisque ce métabolite doit obligatoirement pénétrer dans la mitochondrie pour y être décarboxylé en acétyl-CoA. En effet, le peu d'importance quantitative de sa carboxylation (3.4.1.) vient contredire une éventuelle

redistribution de sa radioactivité par la voie oxaloacétate - malate - fumarate - oxaloacétate, et on aurait pu s'attendre à des résultats mieux différenciés. Nous reprendrons ce problème dans la discussion générale.

Signalons enfin que les résultats concernant l'incorporation des acétates 1- et 2- ^{14}C dans les acides gras ont été confirmés dans une autre expérience destinée aussi à mesurer l'oxydation des deux acétates en $^{14}\text{CO}_2$. Les conditions en sont données sous le paragraphe 3.9. et les résultats dans le tableau 6. A l'exception de celles qui concernent le foie, les valeurs portées sur ce tableau témoignent d'une incorporation beaucoup plus faible que celles du tableau 3. Ce n'est pas surprenant, étant donné le régime particulier des souris de l'expérience 3.9.

3.5. Incorporation de l'acétate 1- et 2- ^{14}C , et du pyruvate 2- et 3- ^{14}C dans les acides gras et le glucose sanguin 3 minutes après l'injection, en présence de fluoroacétate.

(Souris 51 à 74, ♂ de 59 jours, 27,5 à 31,5 g)

Le fluoroacétate et le 2,4-difluorocitrate sont utilisés couramment in vitro comme inhibiteurs de la cis-aconitase, et donc du cycle de Krëbs.

Pour cette raison, nous avons effectué une expérience parallèle à la précédente (4 séries de 6 souris au lieu de 4 séries de 8) en ajoutant, par animal, 0,06 mg de fluoroacétate dans la solution d'injection.

Les résultats obtenus sont semblables à ceux de l'expérience précédente; on constate cependant une forte augmentation de l'écart standard, sauf dans la radioactivité du glucose sanguin formé à partir d'acétate 1- ou 2- ^{14}C . Le fluoroacétate semble donc avoir in vivo un effet beaucoup moins net qu'in vitro. Nous utilisons ici il est vrai une dose de fluoroacétate peut-être trop faible; mais des essais préliminaires avec une dose double avaient entraîné la mort de la plupart des souris.

Nous avons donc renoncé à utiliser les résultats de cette expérience (3.5.), et à les présenter.

3.6. Incorporation du butyrate 1- ou 2-¹⁴C dans le glucose sanguin et les acides gras 10 minutes après l'injection.

(Souris 75 à 88, ♂ de 47 jours, 30 à 35 g)

Pour pouvoir mieux interpréter si possible les résultats obtenus au moyen de l'acétate 1- et 2-¹⁴C et du pyruvate 2- et 3-¹⁴C (3.4.), nous avons encore effectué quelques essais du même type, avec du butyrate 1- ou 2-¹⁴C. En effet, d'après Duchemin (30), le butyrate exogène ne peut pas être utilisé directement comme précurseur des acides gras, mais doit obligatoirement être dégradé au préalable en deux acétyl-CoA (dégradation mitochondriale des acides gras). Ce précurseur est donc censé pénétrer intégralement dans la mitochondrie avant de pouvoir participer à la synthèse des acides gras.

Déroulement de l'expérience : Les animaux, séparés entre t - 20 h et t - 22 h, sont nourris "ad libitum" jusqu'à t - 7 h. 30, puis ils reçoivent chacun 1 g d'aliment "Nafag" toutes les 2 à 3 h jusqu'au moment de l'expérience. Au temps t, ils reçoivent en injection intraveineuse 0,24 ml de NaCl 0,9 % contenant 0,4 mg de butyrate de sodium 1- ou 2-¹⁴C (3,6 μ mole), selon le schéma suivant :

- souris impaires (75, 77 ... 87) $14,4 \cdot 10^6$ dpm de butyrate 1-¹⁴C
- souris paires (76, 78 ... 88) $9,10 \cdot 10^6$ dpm de butyrate 2-¹⁴C

Les animaux sont sacrifiés par décapitation au temps t + 10 min (10 min représentent approximativement le temps après lequel l'incorporation du butyrate ¹⁴C dans les acides gras cesse d'augmenter); la suite de l'expérience se déroule de la même façon que pour les souris 19 à 50 (3.4., p. 30).

Les résultats sont donnés dans le tableau 4 selon les mêmes critères que pour le tableau 3 (3.4., p. 30). Si on les compare à ceux du tableau 3 (pages 30-31), on s'aperçoit que, comme pour le pyruvate, aucune des différences d'incorporation dans les acides gras n'est significative.

En ce qui concerne le tissu adipeux épидидymal, ces résultats sont à comparer aux valeurs correspondantes obtenues à partir du pyruvate 2- et 3-¹⁴C et de l'acétate 1- et 2-¹⁴C (tableaux 3 et 6). L'acétate est le seul précurseur qui donne des valeurs bien différenciées, et c'est pourtant le seul de ces trois métabolites à ne pas être obligé d'emprunter, préalablement à la synthèse des acides gras, une voie strictement mitochondriale. Cette observation fait donc plus que de confirmer

Tableau 4
=====

Souris 75 à 88 : synthèse des acides gras totaux et gluconéogenèse.

Moyennes de 6 ou 7 valeurs, $\pm$ déviation standard. Probabilité de recouvrement (p) d'une valeur moyenne par rapport à la précédente calculée selon la méthode de Student,
n.s. signifie que $p \geq 0,05$.

	Butyrate 1- ¹⁴ C	Butyrate 2- ¹⁴ C
Temps d'exécution (min)	10	10
Nombre d'animaux	7	7
¹⁴ C dans le glucose sanguin, dpm ppm	14 400 $\pm$ 1 040	32 100 $\pm$ 3 165 * p < 0,001
¹⁴ C dans les acides gras de la <u>carcasse</u> , dpm ppm	100 400 $\pm$ 14 650	101 900 $\pm$ 14 500 n.s.
¹⁴ C dans les acides gras du <u>foie</u> , dpm ppm	9 040 $\pm$ 3 560	6 480 $\pm$ 268 * n.s.
¹⁴ C dans les acides gras du <u>tissu adipeux</u> <u>épididymal</u> , dpm ppm	2 040 $\pm$ 432	2 130 $\pm$ 1 109 n.s.
¹⁴ C des acides gras de tout l'animal, %	11,6 % $\pm$ 1,18 % *	11,3 % $\pm$ 1,87 %

* une des 7 valeurs éliminée selon le critère de Chauvenet ;
ces chiffres sont tirés des 6 valeurs restantes.

l'importance de la pénétration de l'acétate dans les mitochondries comme nous l'avons déjà exposé (3.4.2.). Il semble que l'acétyl-CoA originaire du pyruvate et surtout du butyrate ne participe pas identiquement à la synthèse de la partie "oxaloacétate" et de la partie "acétate" du citrate. Si l'origine de l'acétyl-CoA était réellement sans importance, on devrait retrouver entre les séries pyruvate 2- ou 3- ^{14}C , ou entre les séries butyrate 1- ou 2- ^{14}C , des écarts équivalents à celui qui est observé avec l'acétate 1- ou 2- ^{14}C dans la synthèse des acides gras du tissu adipeux épидидymal.

Enfin, les résultats correspondant à la gluconéogénèse (14.400 dpm $\pm$ 1.040 dpm pour le butyrate 1- ^{14}C transformé en glucose sanguin, et 32.100 dpm $\pm$ 3.165 dpm pour le butyrate 2- ^{14}C) sont spécialement intéressants :

Si l'on double les 7 valeurs individuelles du butyrate 1- ^{14}C (on obtient ainsi une moyenne fictive de 29.800 dpm $\pm$ 2.080 dpm) et que l'on effectue de nouveau la statistique de Student en utilisant ces valeurs doublées et les valeurs originales du butyrate 2- ^{14}C , la différence reste significative ($p < 0,05$). En d'autres termes, la probabilité que le butyrate 2- ^{14}C donne un glucose sanguin dont la radioactivité soit seulement deux fois plus forte que celle du glucose obtenu à partir de butyrate 1- ^{14}C est inférieure à 5 %.

La seule façon d'expliquer cette observation est d'admettre que la voie la plus courte (voie (a), pp. 30 et 31) n'est pas la seule utilisée par l'acétyl-CoA provenant du butyrate (contrairement à ce qui se produit avec l'acétyl-CoA de l'acétate, voir p. 32). En effet, si une partie de l'oxaloacétate $^{-}\text{OOC}-^{**}\text{CH}_2-^{**}\text{CO}-^{*}\text{COO}^{-}$ fait un second tour dans le cycle de Krebs au lieu d'être immédiatement décarboxylé en phosphoénolpyruvate, on obtient pour cette partie un nouvel oxaloacétate marqué entièrement au $^{**}\text{C}$, par perte de 2 $^{*}\text{CO}_2$ (transformation identique à celle qui aboutit à l'oxaloacétate (b) de la p. 33). On peut ainsi aboutir à du phosphoénolpyruvate et à du glucose marqués uniquement par du $^{**}\text{C}$ (c'est-à-dire formé à partir du butyrate 2- ^{14}C), pour la partie de l'acétyl-CoA d'origine butyrique ayant effectué un second tour dans le cycle de Krebs.

Ce raisonnement conduit cependant à la conclusion que l'acétyl-CoA venant de l'acétate exogène n'effectue strictement qu'un

seul tour dans le cycle de Krebs, tandis que celui qui vient du butyrate en effectue un ou deux.

En outre, il faut maintenant envisager que les atomes du pyruvate 2- ou 3-¹⁴C peuvent également parcourir plus d'un tour dans le cycle de Krebs. Dans ces conditions, les calculs présentés à la page 32 sont partiellement infirmés, le chiffre de 24 % ne représentant plus qu'une valeur maximum pour la carboxylation du pyruvate avant la gluconéogenèse.

3.7. Effet du butyrate froid en excès sur l'incorporation du butyrate 1-¹⁴C dans les acides gras et le glucose sanguin.

(Souris 89 à 100, ♂)

Il est possible que le butyrate joue un rôle sur la métabolisation de ses propres atomes de carbone, par exemple en activant ou en inhibant certains enzymes. Dans l'expérience précédente, la quantité de 0,4 mg de butyrate par souris nous est imposée par la radioactivité spécifique relativement faible du butyrate 2-¹⁴C. Cela représente, pour ce métabolite, une quantité importante.

La présente expérience est donc destinée à étudier l'effet de deux quantités différentes de butyrate, injectées à deux séries de souris. Son déroulement est identique à celui de l'expérience précédente (3.6.), à l'exception des points suivants :

Chaque souris reçoit $7,05 \cdot 10^6$ dpm de butyrate 1-¹⁴C, selon le schéma suivant :

- souris impaires (89, 91 ... 99) : 0,10 mg de butyrate de sodium
- souris paires (90, 92 ... 100) : 1,00 mg de " " "

Le liquide d'injection de la deuxième série est obtenu en ajoutant, par animal, 0,90 mg de butyrate non marqué à 0,10 mg de butyrate 1-¹⁴C. 0,10 mg et 1,00 mg de butyrate de sodium correspondent respectivement à 0,91 et 9,1 μ moles.

En outre, la dissection est effectuée sans isoler le tissu adipeux épидидymal qui reste donc avec la carcasse; enfin, on réunit les solutions de saponification d'un même organe pour les différents individus d'une même série, si bien que seules les incorporations moyennes dans les acides gras sont connues.

Le tableau 5 donne les résultats de cette expérience selon les mêmes critères que les tableaux 3 et 4.

Tableau 5
=====

Souris 89 à 100 : synthèse des acides gras totaux et gluconéogenèse.

Moyennes de 6 valeurs, $\pm$ déviation standard pour le glucose sanguin. Probabilité de recouvrement (p) d'une valeur par rapport à la précédente calculée selon la méthode de Student, n.s. signifie que $p \geq 0,05$.

	Butyrate 1- ¹⁴ C (0,10 mg)	Butyrate 1- ¹⁴ C (1,00 mg)
Temps d'exécution (min)	10	10
Nombre d'animaux	6	6
¹⁴ C dans le glucose sanguin, dpm ppm	5 160 $\pm$ 345	6 650 $\pm$ 1 930 n.s.
¹⁴ C dans les acides gras de la <u>carcasse</u> , dpm ppm	49 200	51 800
¹⁴ C dans les acides gras du <u>foie</u> , dpm ppm	11 700	9 610
¹⁴ C des acides gras de tout l'animal, %	6,09 %	6,14 %

On notera l'importance de l'écart standard pour la synthèse du glucose sanguin de la série à 1,00 mg de butyrate, ainsi que les baisses importantes d'incorporation dans le glucose sanguin et les acides gras de carcasse par rapport à la série butyrate 1-¹⁴C du tableau 4. Il est évident que les souris 75 à 88 de l'expérience précédente ne sont pas comparables à celles de cette expérience-ci.

Quant aux différences entre la série à 0,10 mg et celle à 1,00 mg de butyrate, elles sont négligeables. Cependant, il ne faut pas perdre de vue la possibilité qu'une action quelconque soit exercée par 0,10 mg de butyrate déjà, action qui n'augmenterait pas entre 0,10 et 1,00 mg.

3.8. Incorporation, dans le tissu adipeux épидидymal, du butyrate 1-¹⁴C dans les acides myristique, palmitique et stéarique et dans leurs carboxyles.

(Souris 75 et 77 de l'expérience 3.6.)

Il existe encore une autre possibilité pour expliquer l'apparente identité d'incorporation, dans les acides gras du tissu adipeux épидидymal, du butyrate 1- et 2-¹⁴C (tableau 4).

En effet, le raisonnement développé à propos de ces résultats (3.6.) s'appuie sur un travail de Duchemin (30) concluant à l'impossibilité, pour le butyrate, de participer à la synthèse des acides gras sans être au préalable scindé en deux acétyl-CoA.

Pour vérifier ce travail, sur lequel repose toute notre argumentation, nous avons réuni les acides gras du tissu adipeux épидидymal des souris 75 et 77, marqués au moyen de butyrate 1-¹⁴C (expérience 3.6.), puis nous avons séparé les acides myristique, palmitique et stéarique. La radioactivité de chacun de ces acides gras, ainsi que celle de leur carboxyle, a été mesurée. Dans les résultats présentés ci-dessous, le rapport d'élongation est calculé selon la méthode présentée à la p. 25 (3.3.). L'unité est celle des tableaux 1 et 2, c'est-à-dire la dpm par μ Curie injectée et par μ mole :

Acide(s) gras (mg)	^{14}C de l'acide	$^{14}\text{COOH}$	Rapport d'élongation
Totaux (434)	4,35		
Myristique (2,10)	40,5	6,47	1,14
Palmitique (48,5)	20,34	2,65	1,05
Stéarique (11,0)	25,17	6,86	3,00

Le rapport d'élongation proche de 1 pour l'acide palmitique confirme que l'acide butyrique est dégradé en deux acétyl-CoA avant de participer à la synthèse des acides gras à longue chaîne.

3.9. Passage du ^{14}C de l'acétate 1- ou 2- ^{14}C dans le CO_2 tissulaire.
(Souris 101 à 118, ♂ de 51 jours, 30 à 34 g)

L'idée de cette expérience remonte à un ancien essai effectué sur la solution de saponification du foie de la souris No 16 (expérience 3.3.2., tableau 2, p. 28). Cet essai, qui avait été motivé par un souci de radioprotection autant que par curiosité, avait révélé que l'acidification de cette solution de saponification provoquait la libération de 0,9 % du ^{14}C injecté à l'animal sous forme de $^{14}\text{CO}_2$. Comparé à celui de 0,88 % qui représente la lipogénèse hépatique du même animal, ce chiffre de 0,9 % nous a paru si considérable que nous avons décidé d'étudier de façon plus systématique la quantité de $^{14}\text{CO}_2$ retrouvée dans les tissus 3 minutes après l'injection d'acétate 1- ou 2- ^{14}C .

Déroulement de l'expérience : Les animaux sont isolés et mis à jeun à t - 39 h. A t - 10 h, chaque animal reçoit 10 g d'aliment "Nafag", dont le reste lui est retiré et pesé à t - 75 min (ceux des animaux qui seront conservés pour l'expérience ont mangé de 2,8 à 5,4 g). Au temps t, les animaux reçoivent, par injection intraveineuse, 0,3 ml de NaCl 0,9 % contenant environ 0,1 μmole d'acétate radioactif, soit :

- souris impaires (101, 103 ... 117) : $12,58 \cdot 10^6$ dpm d'acétate 1- ^{14}C
- souris paires (102, 104 ... 118) : $10,02 \cdot 10^6$ dpm d'acétate 2- ^{14}C .

Les animaux sont sacrifiés au temps t + 3 min et disséqués, ceux d'entre eux dont le tube digestif est le moins bien rempli et qui se sont le moins bien renourris sont éliminés. Le foie, le tissu adipeux et la carcasse de chacun des 12 animaux restants sont saponifiés séparément.

Pour le foie, l'extraction des acides gras est effectuée sur deux fois 6 parties aliquotes des 12 solutions de saponification, réunies 6 par 6. On obtient donc les moyennes des incorporations des deux séries dans les acides gras, sans écart standard ni statistique. La libération du $^{14}\text{CO}_2$ tissulaire a lieu cependant sur 2 échantillons de chacune des 12 solutions. (2.8.1. et fig. 6)

Pour le tissu adipeux épидидymal, la totalité de chacune des 12 solutions de saponifications est consacrée à une extraction séparée

des acides gras, à l'exception de celles des souris 112 et 113 sur chacune desquelles sont prélevés au préalable deux échantillons pour la mesure du $^{14}\text{CO}_2$ tissulaire.

Pour la carcasse, la mesure séparée de la radioactivité des acides gras et du $^{14}\text{CO}_2$ tissulaire a lieu pour tous les animaux conservés.

Le tableau 6 donne les résultats de cette expérience, selon les mêmes critères que les trois tableaux précédents.

Ceux concernant le CO_2 tissulaire peuvent être interprétés de la manière suivante :

3.9.1. Calcul de la durée de vie moyenne du cycle de Krebs en nombre de tours.

L'écart entre le $**\text{CO}_2$ (soit le $^{14}\text{CO}_2$ produit par la combustion de l'acétate 2- ^{14}C) et le $*\text{CO}_2$ ($^{14}\text{CO}_2$ en provenance de l'acétate 1- ^{14}C) peut être attribué principalement au cycle de Krebs. Si l'on néglige l'effet de tous les autres mécanismes CO_2 -formateurs, quantitativement beaucoup moins importants (sauf peut-être la gluconéogénèse à partir d'oxaloacétate, dans le foie), il est possible de relier mathématiquement le rapport $**\text{CO}_2/*\text{CO}_2$ (tissulaire) au nombre moyen de tours qu'effectue le cycle de Krebs avant que ses intermédiaires ne le quittent pour être utilisés dans une autre voie métabolique.

Précisons encore que le raisonnement qui va suivre s'appuie sur deux faits :

- l'ordre de grandeur pour la "vitesse de rotation" du cycle de Krebs est de 100 tours par minute (31).
- Le CO_2 tissulaire représente le CO_2 produit par l'organe ou l'animal juste avant le sacrifice, pendant une unité de temps de l'ordre de la minute (à 3 minutes de l'injection, on retrouve au maximum le tiers du CO_2 total dans les tissus).

En suivant les atomes $**\text{C}$ et $*\text{C}$ de l'acétate dans le cycle de Krebs (figure 7), on obtient la répartition suivante :

Tableau 6
=====

Souris 101 à 118: synthèse des acides gras totaux et combustion dans les tissus.

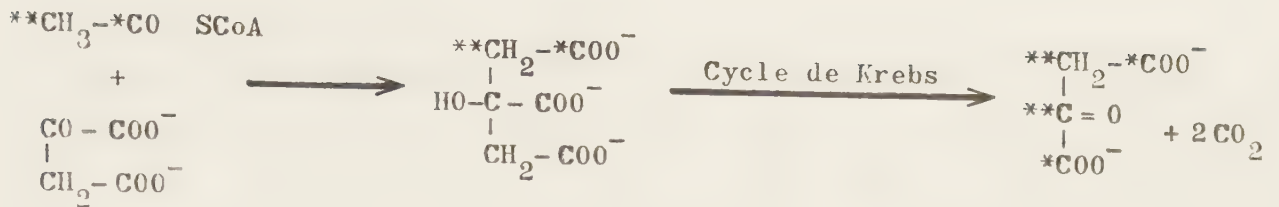
Moyennes de 5 à 6 valeurs, $\pm$ déviation standard le cas échéant.
 Probabilité de recouvrement (p) d'une valeur moyenne par rapport à la précédente calculée selon la méthode de Student,
 n.s. signifie que l'écart entre une valeur moyenne et la précédente n'est pas significatif ($p \geq 0,05$).

	Synthèse dans les acides gras		Combustion dans les tissus ($^{14}\text{CO}_2$)	
	Acétate $1-^{14}\text{C}$	Acétate $2-^{14}\text{C}$	Acétate $1-^{14}\text{C}$	Acétate $2-^{14}\text{C}$
Temps d'exécution (min)	3	3	3	3
Nombre d'animaux	6	6	6	6
^{14}C dans la carcassé, dpm ppm	51 500 * $\pm$ 8 810	55 120 $\pm$ 5 660 n.s.	132 550 $\pm$ 15 000	89 800 $\pm$ 6 700 p 0,001
^{14}C dans le foie, dpm ppm	2 940	3 070	11 620 $\pm$ 1 530	7 620 $\pm$ 690 p<0,001
^{14}C dans le tissu adipeux épидidymal, dpm ppm	288 * $\pm$ 191	722 * $\pm$ 106 p<0,005	(875)**	(531)**
^{14}C dans tout l'animal, %	5,47 %	5,95 %	14,47 %	9,79 %

* une des 6 valeurs éliminées selon le critère de Chauvenet. Ces chiffres sont tirés des 5 valeurs restantes.

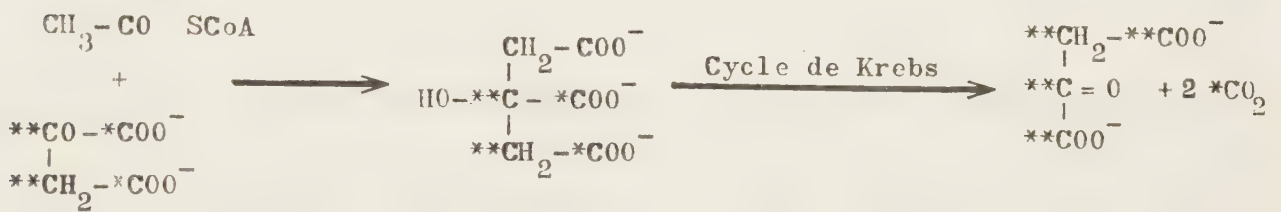
** Ces chiffres ne sont pas une moyenne ; ils ne concernent qu'un seul animal chacun.

Figure 7



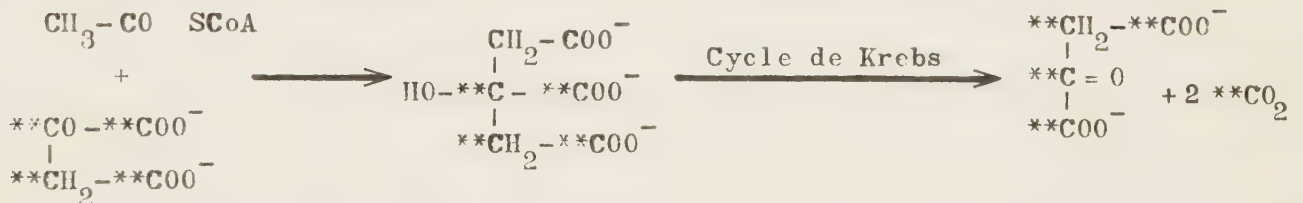
Pour simplifier le raisonnement, on ne compte pas ce premier tour, qui ne produit pas de $^{14}\text{CO}_2$.

1^{er} tour :



La totalité du ***C** est transformée en ***CO₂**.

2^e tour :



La moitié du ****C** est transformée en ****CO₂**, l'autre moitié restant sur l'oxaloacétate prêt à entamer un...

3^e tour :

Le schéma est le même ; la moitié du ****C** de l'oxaloacétate ayant entamé ce 3^e tour, c'est-à-dire le 25 % de la quantité initiale, est transformé en ****CO₂** ; au total, le 75 % du ****C** est brûlé.

4^e tour :

Même schéma, combustion de 12,5 % du ****C** initial (total = 87,5 %).

Ainsi de suite, la quantité totale de ****C** brûlé se rapproche de 100 % et le rapport ****CO₂/CO₂** tend vers 1.

à la fin du tour N° :	*CO ₂ (total)	**CO ₂ pour ce tour :	**CO ₂ total :	**CO ₂ /*CO ₂
1	100 %	0	0	0
2	100 %	50 %	50 %	0,5
3	100 %	25 %	75 %	0,75
4	100 %	12,5%	87,5%	0,875
Z				$1 - 2^{(1-Z)}$

Pour calculer le nombre moyen de tours Z en fonction du rapport $**CO_2/*CO_2$ que nous appellerons désormais W , soit $Z = f(W)$, on peut par exemple généraliser à partir des valeurs ci-dessus, ce qui donne :

$$W = 1 - 2^{(1 - Z)} \quad \text{qu'on peut résoudre par rapport à Z :}$$

$$2^{(1 - Z)} = 1 - W$$

$$\ln 2 \cdot (1 - Z) = \ln(1 - W)$$

$$\text{et } Z = 1 - \frac{\ln(1 - W)}{\ln 2} \quad \text{ou} \quad Z = 1 - 1,443 \ln(1 - W)$$

Ou encore en logarithmes base 10 :

$$\log 2 \cdot (1 - Z) = \log(1 - W)$$

$$Z = 1 - \frac{\log(1 - W)}{\log 2} \quad \text{ou} \quad Z = 1 - 3,32 \log(1 - W)$$

On peut également dessiner la fonction $Z = f(W)$ point par point pour $Z = 0, 1, 2$, etc. ce qui donne une courbe de forme

$K \cdot Z = L + \ln(N-W)$. Il est alors possible de déterminer les paramètres

fixes K, L et N par un système de 3 équations où ils jouent le rôle d'inconnues, en assignant à Z et donc à W, 3 valeurs numériques quelconques.

Cette méthode, plus longue mais plus rigoureuse, donne le même résultat.

En appliquant ces formules aux résultats du tableau 6, on obtient les résultats suivants :

<u>Carcasse</u> :	W = 0,677 et Z = 2,635 tours
<u>Foie</u> :	W = 0,656 et Z = 2,540 tours
<u>Tissu adipeux</u> <u>épididymal</u> :	W = 0,607 et Z = 2,347 tours

Si le résultat obtenu avec la carcasse est sans doute proche de la réalité, celui concernant le foie ne correspond qu'à une valeur minimale. Le $^{14}\text{CO}_2$ produit par cet organe lors de la décarboxylation de l'oxaloacétate $^-\text{OO}^*\text{C}-^{**}\text{CH}_2-^{**}\text{CO}-^*\text{COO}^-$ en phosphoénolpyruvate n'est certainement pas négligeable, en raison de l'importance quantitative de la gluconéogenèse hépatique.

Quant au nombre de tours moyen donné pour le tissu adipeux épididymal, il n'a qu'une valeur indicative puisque le rapport W ne concerne que deux valeurs individuelles.

Enfin, l'importance globale du $^{14}\text{CO}_2$ tissulaire du tissu adipeux épididymal, comparée à celle du ^{14}C des acides gras de ce même tissu, présente un intérêt dans un autre domaine : cette forte combustion traduit en effet une consommation en énergie que la seule synthèse des acides gras est loin de pouvoir justifier (même si l'on oublie que, à 3 minutes, la majorité du $^{14}\text{CO}_2$ a déjà quitté les lieux). Il semble donc qu'il existerait, dans ce tissu adipeux épididymal, outre la synthèse des acides gras, un autre mécanisme grand consommateur d'énergie.

3.10. Passage du ^{14}C de l'acétate 1- ou 2- ^{14}C dans le CO_2 tissulaire et dans le CO_2 respiratoire, 3 et 15 minutes après l'injection.

(Souris 119 à 124, ♂ de 51 jours).

Les calculs effectués à partir des résultats de l'expérience précédente nous ont permis de comparer dans une certaine mesure la

combustion des acétates 1- et 2-¹⁴C dans le foie et dans le tissu adipeux. Il nous a paru également important de réaliser la même expérience en mesurant le ¹⁴CO₂ respiratoire total de l'animal. D'autre part, il est intéressant de voir si, en prolongeant l'expérience pendant 15 minutes, les résultats obtenus sont cohérents avec ceux des expériences à 3 minutes.

Déroulement de l'expérience : Les animaux sont isolés au temps t - 21 h et nourris "ad libitum" jusqu'au temps t - 7 h. A ce moment, puis aux temps t - 4 h 30' et t - 45', ils reçoivent chacun 1 g d'aliment "Nafag". Au temps t, on leur administre par voie intraveineuse 0,3 ml de NaCl 0,9 % contenant 0,1 μmole d'acétate 1- ou 2-¹⁴C selon le schéma suivant :

Souris 119, 121 et 123 : 6,00·10⁶ dpm d'acétate 1-¹⁴C
souris 120, 122 et 124 : 19,92·10⁶ dpm d'acétate 2-¹⁴C.

Immédiatement après l'injection (au maximum 10 secondes), les souris sont placées dans les cages métaboliques décrites dans la partie technique (2.6.2.). 5 secondes avant le sacrifice, les cages sont ouvertes pendant 2 à 3 secondes pour en retirer les souris, qui sont exécutées selon l'horaire suivant :

Sacrifice à t + 3 min : souris 119 à 122
sacrifice à t + 15 min : souris 123 et 124.

Le reste de l'expérience se déroule de la même façon que la précédente. La mesure du ¹⁴CO₂ respiratoire se fait en introduisant, dans le ballon de l'appareil servant également à la mesure du ¹⁴CO₂ tissulaire (2.8.1. et fig. 6), 10 ml prélevés dans les absorbeurs des cages métaboliques.

Les résultats sont présentés dans le tableau 7. La souris 119 donne des valeurs qui ne sont en accord ni avec les souris 120 à 122, ni avec les souris 101 à 118 de l'expérience précédente. Les résultats du calcul sur le nombre de tours Z sont donc un peu différents de ceux de l'expérience précédente (à 3 min.) :

<u>Carcasse</u> :	W = 0,402	et Z = 1,742
<u>Foie</u> :	W = 0,622	Z = 2,404
<u>Tissu adipeux épидидymal</u> :	W = 0,526	Z = 2,078

Tableau 7

Souris 119 à 124 : synthèse des acides gras totaux, combustion dans les tissus et $^{14}\text{CO}_2$ respiratoire, 3 et 15 minutes après l'injection d'acétate ^{14}C .

Tous les résultats en dpm ppm	sacrifice à 3 minutes		sacrifice à 15 minutes	
	Acétate $1-^{14}\text{C}$ souris 119, souris 121, moyenne	Acétate $2-^{14}\text{C}$ souris 120, souris 122, moyenne	Acétate $1-^{14}\text{C}$ souris 123	Acétate $2-^{14}\text{C}$ souris 124
$^{14}\text{CO}_2$ respiratoire	241 500, 211 500, <u>226 500</u>	107 700, 129 400, <u>118 550</u>	505 000	400 000
$^{14}\text{CO}_2$ tissulaire de la carcasse	210 000, 97 400, <u>153 700</u>	62 700, 60 700, <u>61 700</u>	28 900	31 100
^{14}C des acides gras de la carcasse	167 000, 123 800, <u>190 400</u>	136 700, 152 700, <u>144 700</u>	157 000	139 600
$^{14}\text{CO}_2$ tissulaire du foie	11 680, 9 120, <u>10 400</u>	7 010, 5 900, <u>6 455</u>	2 616	2 885
^{14}C des acides gras du foie	9 580, 5 700, <u>7 640</u>	16 910, 13 800, <u>15 355</u>	8 600	8 010
$^{14}\text{CO}_2$ tissulaire adipeux épидидymal	1 125, 548, <u>836</u>	542, 338, <u>440</u>	173	150
^{14}C des acides gras du tissu adipeux épидидymal	4 630, 4 140, <u>4 385</u>	4 430, 2 585, <u>3 508</u>	3 740	4 530
$^{14}\text{CO}_2$ total	<u>391 400</u>	<u>187 200</u>	536 700	434 100
^{14}C des acides gras de tout l'animal	<u>157 400</u>	<u>164 000</u>	169 300	152 140

L'ordre de grandeur est cependant confirmé. Il ne faut pas oublier non plus que les souris de cette expérience ont pu avoir, dans la cage métabolique parcourue par un courant d'air assez violent, un métabolisme différent de celles de l'expérience précédente.

Quant aux résultats concernant le $^{14}\text{CO}_2$ tissulaire à 15 minutes, leur similitude laisse supposer qu'après un certain temps, la redistribution tend à effacer la différence observée aux temps plus courts, cette différence étant pourtant toujours visible dans le CO_2 respiratoire produit tout au long des 15 minutes.

3.11. Expérience "in vitro" : Combustion de l'acétate 1- ou 2- ^{14}C par les mitochondries de foie de souris.

Les conditions de cette incubation sont déjà décrites dans la partie technique (2.9.). Précisons cependant que les résultats donnés dans le tableau 8 ont été obtenus en utilisant une suspension mitochondriale contenant 6,2 mg de protéines dans les 2,5 ml de chacun des flacons. Dans ces circonstances, il n'y a pas lieu de ramener les résultats à 1 mg de protéines, et les valeurs sont données, comme pour les expériences in vivo, en dpm par million de dpm introduits dans le flacon (dpm ppm). Les activités réellement introduites sont les suivantes :

acétate 1- ^{14}C (flacons 1 - 2 - 3 et 7 à 11) : 666700 dpm (2 μmoles)
acétate 2- ^{14}C (" 4 - 5 - 6 et 12 à 16) : 992300 dpm (2 μmoles).

Les flacons 17 à 22 sont utilisés pour les mesures à blanc. La suspension mitochondriale a été chauffée pendant 10 minutes au bain-marie bouillant (17 à 20) ou remplacée par un volume égal de solution de saccharose 0,25 M (21 et 22). La moyenne de ces 6 incubations à blanc est de 405 dpm ppm, l'importance de ce chiffre pouvant être attribuée à la diffusion dans le flacon d'une petite quantité de précurseur sous la forme d'acide acétique ou de son azéotrope avec l'eau (voir p.19). Signalons cependant qu'aucun des 12 essais techniques préliminaires n'a donné de valeur à blanc sensiblement inférieure, même en remplaçant l'acide trichloracétique utilisé pour stopper la réaction par de l'acide acétique.

Tableau 8
=====

Combustion in vitro de 2 μ moles d'acétate 1- ou 2- ^{14}C par les mitochondries de foie de souris à 37° C.

En multipliant les résultats (en dpm ppm) par 2, on obtient les picomoles de CO_2 produites.

Les conditions expérimentales complètes sont données aux pages 21 et 46.

(n° de l'essai) substrat <u>temps</u> <u>d'incubation</u>		$^{14}\text{CO}_2$, dpm ppm	moyenne	rapport W (= $\frac{^{14}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2}$, voir figure 7)	
(1)	Acétate 1- ^{14}C <u>15 minutes</u>	5755	5545	0,035	
(2)		5039			
(3)		5841			
(4)	Acétate 2- ^{14}C <u>15 minutes</u>	192	195		0,035
(5)		198			
(6)		0*			
(7)	Acétate 1- ^{14}C <u>30 minutes</u>	8648	9080	0,061	
(8)		8747			
(9)		9879			
(10)		9081			
(11)		9045			
(12)	Acétate 2- ^{14}C <u>30 minutes</u>	369	553		0,061
(13)		452			
(14)		716			
(15)		536			
(16)		690			

* l'essai n° (6) donne une radioactivité égale à celle des essais à blanc. Nous avons donc renoncé à en tenir compte.

Si l'on essaie d'appliquer aux résultats du tableau 8 la formule utilisée pour le calcul du nombre de tours dans le cycle de Krebs, $Z = 1 - 1,443 \cdot \ln(1 - W)$, on obtient :

Incubation de 15 minutes : $W = 0,035$ et $Z = 1,051$ tours

Incubation de 30 minutes : $W = 0,061$ et $Z = 1,091$ tours

Ces résultats pourraient s'interpréter de la façon suivante : l'oxaloacétate prémarqué par l'acétyl-CoA au cours d'un premier tour dans le cycle de Krebs ($^{-}OO^{*}C-^{*}CO-^{*}CH_2-^{*}COO^{-}$, voir fig. 7) n'effectue guère plus d'un seul tour supplémentaire en moyenne ("1er tour" dans la figure 7). Ceci expliquerait que la combustion ne soit pas plus importante : une faible partie seulement de l'oxaloacétate prémarqué se condenserait à nouveau avec l'acétyl-CoA pour participer à un tour supplémentaire et donner naissance à du $^{*}CO_2$ (environ 0,9 % pour les incubations de 30 minutes), et une partie encore beaucoup plus faible de l'oxaloacétate $^{-}OO^{*}C-^{*}CO-^{*}CH_2-^{*}COO^{-}$ produit à l'issue de ce "1er tour" participerait au "2e tour" pour ne plus produire qu'une quantité négligeable de $^{*}CO_2$.

Mais, en pratique, les postulats que nous avons admis pour calculer le nombre de tours chez l'animal vivant ne sont probablement plus du tout valables dans les expériences in vitro, en particulier la "vitesse de rotation" du cycle de Krebs. En effet, si le temps moyen pour un tour devient non négligeable par rapport au temps de l'expérience, la formule pour le calcul de Z n'est plus applicable.

4. DISCUSSION et CONCLUSIONS

4.1. Introduction.

Les expériences décrites dans ce mémoire ont conduit à des résultats dont le sens est assez varié. Certains d'entre eux ont une portée avant tout méthodologique, d'autres précisent des notions biochimiques encore mal connues. Les uns sont sans équivoque et s'expliquent sans difficulté; d'autres, comme c'est souvent le cas pour les expériences exécutées in vivo, donnent lieu à des interprétations fondées sur des "à priori" plus ou moins reconnus et exigent une discussion assez ardue; les derniers de ces résultats enfin n'ont que le mérite de permettre de nouvelles hypothèses de travail.

Malgré leur diversité, ces expériences sont toutes centrées sur l'un des précurseurs les plus utilisés dans l'étude du métabolisme intermédiaire, l'acétate. En outre, elles intéressent toutes l'aspect le plus central de ce métabolisme, puisque toutes gravitent autour du cycle de Krebs. Elles utilisent des techniques variées, mais l'accent est mis sur l'une des plus sûres pour ce genre de recherches : la comparaison des transformations subies par deux précurseurs qui ne diffèrent l'un de l'autre que par la position de l'isotope dans la molécule.

Nous résumerons seulement les résultats des expériences qui n'exigent pas de discussion générale et nous chercherons à faire dire aux autres tout ce qu'elles peuvent, mais en nous efforçant, ce qui n'est pas toujours facile, d'éviter les spéculations trop risquées.

4.2. Mise au point préliminaire.

Aucun chercheur spécialisé dans la synthèse des acides gras ne paraît douter que l'acétyl-CoA (converti transitoirement ou non en malonyl-CoA) représente l'élément constitutif presque unique de cette synthèse, et qu'en outre les positions respectives des atomes pairs et impairs ne peuvent être interverties au cours de cette opération. Cette règle ne souffre guère d'exception. Citons cependant la possibilité pour le propionyl-CoA de remplacer l'acétyl-CoA, avec pour résultat la synthèse des rares acides gras impairs existant chez l'animal supérieur (32). L'utilisation directe du butyrate et du butyryl-CoA n'a été signalée que dans quelques essais in vitro qui n'ont d'ailleurs pas été reproduits à notre connaissance; in vivo, en revanche,

elle n'est pas possible (30) et nous l'avons confirmé. Une synthèse directe à partir du butyrate aurait en effet permis d'expliquer plus facilement certains autres résultats.

D'autre part, et bien qu'aucune voie connue du métabolisme intermédiaire ne permette de le prévoir, d'anciens articles admettaient la possibilité pour le carbone 1 de l'acétate d'apparaître dans les positions paires des acides gras (2). Nous avons repris cette étude et infirmé cette possibilité qui pouvait en effet modifier complètement l'interprétation de nos autres résultats. Rappelons en effet que la redistribution inverse, c'est-à-dire le passage du C_2 de l'acétate dans les carbones impairs est bien connue et très notable.

4.3. Réutilisation ou conservation de l'hydrogène de l'acétate dans les acides gras.

Nos résultats concernant ce problème appellent un peu plus de commentaires. Ils concernent à la fois l'origine de l'hydrogène nécessaire à la réduction des molécules d'acétate, et la nature des mécanismes permettant la condensation ou l'élongation des acides gras. Nous avons pu constater, grâce à l'utilisation d'acétate marqué par du 3H et du ^{14}C que si le mécanisme de condensation conduisant principalement à l'acide palmitique s'accompagne d'une perte assez considérable de l'hydrogène de l'acétate par rapport à la théorie, la fixation sur ce palmityl-CoA de l'acétyl-CoA qui le transforme en acide stéarique provoque une perte encore bien plus grande.

Il importe de bien préciser que la synthèse de toutes les molécules d'acide stéarique ne se fait pas de la même manière : Dans un premier temps après l'injection de l'acétate radioactif (ordre de grandeur : 2 à 3 minutes), la concentration en traceur est suffisante pour marquer beaucoup plus fortement les carbones 1 et 2 de ce stéarique que les carbones 3 à 18, ces derniers provenant principalement du palmityl-CoA froid, déjà synthétisé avant l'entrée en lice de l'acétate marqué.

Dans un deuxième temps, la situation a tendance à s'inverser : l'acétate chaud est dilué de plus en plus par de l'acétate endogène beaucoup moins marqué (provenant principalement de la dégradation des glucides ou de celle, précisément, des acides gras), tandis que l'acide palmitique ^{14}C ,

synthétisé très rapidement au début ne se dégrade que très lentement. Les travaux de Dupuis (29) rendent compte de façon particulièrement nette de ce phénomène.

En ce qui concerne le ^3H , la situation est différente : il peut rester fixé au carbone 2 de l'acétate pendant tout le processus, comme il peut le quitter complètement pour être partiellement récupéré par la suite. Cette dernière possibilité est difficilement admissible à cause de la très forte dilution par de l'hydrogène froid (même en admettant que ce ^3H ne soit pas immédiatement protonisé, mais puisse être fixé transitoirement sur un transporteur tel que le NAD^+ ou le NADP^+); cependant, il paraît tout aussi peu vraisemblable que le ^3H puisse rester fixé au carbone pendant tout le processus de synthèse (que ce soit par condensation ou par élongation) : le β -cétoacyl-CoA (ou β -cétoacyl-ACP) est un thioester d'acide β -cétonique et devrait, en tant que tel, se trouver également sous la forme tautomère énolique, faiblement acide (33). Cette forme impliquerait la perte, par échange avec les H^+ de la solution, de la totalité du ^3H de l'élément dicarboné nouvellement lié.

Le ^3H retrouvé malgré tout sur les méthylènes des acides proviendrait donc, malgré la dilution, des NAD^3H et NADP^3H formés pendant la combustion (mitochondriale) d'une autre partie de l'acétate $2\text{-}^3\text{H}$, et pourrait même être récupéré, à partir du $^3\text{H}^+$ perdu par la forme énolique précédente, lors de la réduction par du $\text{NADH} + ^3\text{H}^+$ ou du $\text{NADPH} + ^3\text{H}^+$, à condition toutefois d'admettre que ce $^3\text{H}^+$ n'ait eu ni le temps, ni la possibilité géométrique de s'éloigner notablement des lieux de synthèse par diffusion.

La "perte" plus forte en ^3H sur le carbone 2 de l'acide stéarique (tableaux 1 et 2, pp. 26 et 28), par rapport à celle des carbones 4 à 16 devrait alors être considérée comme une moindre récupération à partir des transporteurs, due à une synthèse plus lente. La "perte" encore plus considérable constatée sur les animaux à jeun nous autorise à pencher pour cette dernière hypothèse, car le jeun implique une concentration en nucléotide réduit augmentée (34), ce qui peut diluer encore plus le ^3H .

L'hypothèse de la récupération exige une mise au point quant à la signification exacte du rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ des éléments dicarbonés après

condensation ou élongation (dernière colonne des tableaux 1 et 2) : une récupération de ^3H en cours de synthèse implique que celui-ci se fixera non plus seulement sur le carbone pair de l'élément dicarbone qui vient de s'ajouter à la chaîne, mais également sur le carbone précédent. Cela ne change rien aux calculs de la page 27, mais implique que lorsqu'on parle de "rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ d'un élément dicarbone donné", on tient compte également du ^3H récupéré par l'atome de carbone pair de l'élément précédent par l'adjonction de l'élément considéré.

4.4. Passage de l'acétate 1- ou 2- ^{14}C dans le glucose sanguin.

L'existence et le mécanisme du cycle de Krebs ont été établis par un grand nombre d'expériences concordantes; on peut donc se dispenser de lui chercher des confirmations. Il était cependant intéressant d'étudier la formation du glucose à partir des acétates 1- ou 2- ^{14}C , pour vérifier si les résultats correspondaient entièrement à ce que permet de prévoir la théorie. On peut facilement constater sur un schéma du cycle de Krebs et de la gluconéogenèse que le ^{14}C de l'acétate 2- ^{14}C a au moins deux fois plus de chances d'apparaître dans le glucose que le ^{14}C de l'acétate 1- ^{14}C . C'est bien là ce que nous constatons. Cette confirmation nous était d'autre part indispensable pour connaître d'une façon aussi complète que possible la destinée de l'acétate.

4.5. Passage du pyruvate 2- ou 3- ^{14}C dans le glucose sanguin.

Pour mieux comprendre la destinée de l'acétate exogène, il fallait pouvoir la comparer à celle de l'acétate provenant de la décarboxylation du pyruvate. Nos résultats nous permettent tout d'abord de confirmer qu'une proportion importante du pyruvate pénétrant dans la mitochondrie n'était pas simplement décarboxylée en acétate. Le calcul proposé à la p. 32 tient compte des voies les plus représentatives de la destinée du pyruvate mais fait abstraction de l'oxaloacétate qui a déjà parcouru plus d'un tour dans le cycle de Krebs. Le chiffre de 24 % pour la proportion du pyruvate qui se carboxyle plutôt que de se décarboxyler avant de participer à la gluconéogenèse représente seulement une estimation maximum.

4.6. Incorporation des acétates 1- et 2-¹⁴C, des butyrates 1- et 2-¹⁴C et des pyruvates 2- et 3-¹⁴C dans les acides gras.

Ce n'est que dans le tissu adipeux épидидymal que l'on peut constater une plus forte incorporation de l'acétate 2 que de l'acétate 1-¹⁴C. Cette observation démontre que dans ce tissu l'acétate doit obligatoirement pénétrer dans les mitochondries en proportion importante. Ce phénomène peut s'expliquer de deux façons :

1) l'acétyl thiokinase qui est nécessaire à l'activation de l'acétate en acétyl-CoA est beaucoup moins active dans le tissu adipeux que dans les autres tissus.

2) L'enzyme clivant le citrate est beaucoup moins active également dans ce tissu adipeux épидидymal que dans le foie (35). Donc, l'acétate qui a pénétré dans les mitochondries et s'est combiné avec de l'oxaloacétate aura moins tendance à ressortir rapidement sous forme de citrate qui risquerait alors de s'accumuler plus ou moins dans le milieu extramitochondrial, au lieu d'être clivé en acétyl-CoA et en oxaloacétate. Ce citrate sera ainsi davantage utilisé par le cycle de Krebs (mitochondrial), perdant ainsi l'ex-atome de carbone n° 1 de l'acétate original.

On peut s'étonner de ne pas retrouver, avec les butyrates 1- et 2-¹⁴C, des résultats au moins aussi bien différenciés qu'avec les acétates correspondants. Une explication serait que ces butyrates, n'ayant pu être administrés à doses traceuses, peuvent accroître le pool NADH intramitochondrial et accélérer la diffusion de l'oxaloacétate hors de la mitochondrie sous forme de malate. Le malate est en effet le transporteur des éléments tétracarbonés chez la souris (36). Cela expliquerait aussi la très forte incorporation du butyrate dans le glucose circulant que nous avons constatée dans la même expérience, ainsi que le fait que le cycle de Krebs paraisse tourner un plus grand nombre de fois qu'avec l'acétate : celui-ci serait en effet "obligé d'économiser" son oxaloacétate.

L'identité apparente, dans le tissu adipeux épидидymal toujours, de l'incorporation des atomes 2 et 3 du pyruvate dans les acides gras, peut s'expliquer plus simplement. En effet, si les 24 % environ du pyruvate destiné à la gluconéogenèse se carboxylent, on peut supposer que, dans son ensemble, ce précurseur est relativement

fortement carboxylé. Or, cette carboxylation est accompagnée d'une redistribution des positions 2 et 3 par l'intermédiaire du fumarate (8). De plus, le fait que le cycle de Krebs ne tourne que 2 à 3 fois, comme nous l'avons démontré (3.9. et 3.10), met en relief la nécessité, pour l'oxaloacétate, d'un renouvellement important dont la carboxylation de pyruvate pourrait fournir une bonne part.

4.7. Combustion dans les tissus.

Il est normal que personne, jusqu'ici, n'ait eu l'idée de mesurer la radioactivité du $^{14}\text{CO}_2$ se trouvant dans les tissus au moment de l'exécution, dans les expériences in vivo utilisant un précurseur marqué à ^{14}C . La circulation complète du sang et par conséquent le renouvellement de son CO_2 durent, chez la souris, entre 5 et 10 secondes, et il est évident que, si celle-ci brûle, en 3 minutes, environ 290 000 dpm ppm de l'acétate ^{14}C injecté (tableau 7), le sang total, au moment du sacrifice, ne doit pas contenir plus de 1000 dpm ppm. Il était donc normal de penser que le $^{14}\text{CO}_2$ présent dans les tissus de tout l'animal, était, à ce moment, du même ordre de grandeur.

Nous avons été les premiers surpris de trouver des taux de l'ordre de 10 fois supérieur aux valeurs prévisibles (tableau 6), et qui ne peuvent s'expliquer que par une élimination relativement lente du CO_2 (ou du HCO_3^-) par les tissus. Le taux relativement élevé du $^{14}\text{CO}_2$ tissulaire du tissu adipeux épидидymal, en particulier, dénote une concentration très forte de CO_2 : celui-ci étant, à l'évidence, insoluble dans les lipides, il ne reste que 5 à 10 mg dans la phase aqueuse du cytoplasme pour l'accueillir. On doit donc également admettre que, dans ce tissu, les 500 à 1000 dpm ppm retrouvés au moment du sacrifice (tableaux 6 et 7) ne représentent qu'une petite partie du $^{14}\text{CO}_2$ total produit pendant les 3 minutes de l'expérience. Comparée aux 300 à 800 dpm ppm des acides gras du tissu adipeux épидидymal (expérience 3.9. et tableau 6), cette proportion élevée est étonnante. Rappelons en effet que la combustion d'un acétate en CO_2 produit 1,5 à 1,6 fois plus d'énergie que n'en consomme la réduction et l'incorporation du même acétate dans les acides gras.

C'est un des nombreux problèmes que soulèvent ces premiers résultats concernant le $^{14}\text{CO}_2$ tissulaire à partir d'acétate ^{14}C .

Les différences entre le $^{14}\text{CO}_2$ produit par l'acétate 1- ou 2- ^{14}C , parfaitement significatives dans tous les cas où le nombre de résultats était suffisant pour autoriser une étude statistique, nous ont conduit à proposer une méthode de calcul du nombre de tours moyen du cycle de Krebs. Les résultats obtenus peuvent être interprétés de la manière suivante :

Pour le tissu adipeux épидидymal le nombre de tours est probablement compris entre 2 et 3, mais nous n'avons pas assez de résultats pour avancer une valeur plus précise.

Dans le foie, on doit considérer le chiffre de 2,5 tours comme une valeur minimale. Pour aboutir à une valeur plus précise, il faudrait soustraire du nombre de dpm représentant le $^{14}\text{CO}_2$ obtenu à partir d'acétate 1- ^{14}C , celui, certainement important, correspondant au $^{14}\text{CO}_2$ produit lors de la décarboxylation de l'oxaloacétate en phospho-énolpyruvate (gluconéogénèse).

Pour la carcasse enfin, la valeur de 2,6 tours implique un renouvellement fréquent de l'oxaloacétate qui doit être principalement obtenu par carboxylation du pyruvate provenant lui-même de la dégradation des glucides. Dans ces conditions, l'alimentation des animaux doit jouer un assez grand rôle; parmi les nombreux développements de ce travail qui pourraient être proposés, il serait intéressant d'étudier le même problème avec des animaux à jeun : on obtiendrait sans doute un chiffre beaucoup plus élevé pour le nombre de tours.

B I B L I O G R A P H I E

- (1) BARTH C, SLADEK M. et DECKER K., Biochim. biophys. Acta, 260, 1-9 (1972).
- (2) DAUBEN N.G., HOERGER E. et PETERSEN J.W., J. amer. chem. Soc., 75, 2347-2351 (1953).
- (3) GEISSBÜHLER F., Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève (1964).
- (4) DUNN E. et ROBSON P., J. Chromatog., 17, 501-505 (1965).
- (5) GRANGE F., Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève, No 1603 (1972).
- (6) HOFMANN K., HSIAO C.Y.Y., HENIS D.B. et PANOS C., J. biol. Chem., 217, 49-60 (1955).
- (7) LASKER R. et THEILACKER G.H., J. Lipid Res., 3, 60-64 (1962).
- (8) MERMIER P., FAVARGER P. et LEVRAT B., Biochemistry, 10/18, 3448-3456 (1971).
- (9) HOWARD G.A. et MARTIN A.J.P., Biochem. J., 46, 532-538 (1950).
- (10) BUCHS-MOGHISSI M., Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève, No 1394 (1965).
- (11) ANKER S.H., J. biol. Chem., 194, 177-182 (1952).
- (12) MEAD J.F. et HOWTON D.R., "Radioisotope studies of fatty acid metabolism", Pergamon Press, London, 123 (1960).
- (13) SCHMIDT K.F., cité par FIESER F. et FIESER M., "Advanced Organic Chemistry", Reinhold Publishing Corporation, New York, 502 (1962).
- (14) PHARES E.F., Arch. Biochem. Biophys., 33, 173-178 (1951).
- (15) BRADY R.O., BRADLEY R.M. et TRAMS E.G., J. biol. Chem., 235, 3093-3098 (1960).
- (16) FOURNIER N., communication personnelle, (1970).
- (17) HENDLER R.W., Anal. Biochem., 7, 110-120 (1964).
- (18) SOMOGYI M., J. biol. Chem., 160, 69 (1945).
- (19) DUBEWSKI K.M., Clin. Chem., 8, 215-219 (1962).
- (20) MYVÄRINEN A. et NIKKILÄ E.A., Clin. chim. Acta, 7, 140-143 (1962).
- (21) CORREDOR L., BRENDÉL K. et BRESSLER R., Proc. nat. Acad. Sci., 58, 2299-2307 (1967).
- (22) "Handbook of Chemistry and Physics", éd. The Chemical Rubber, 46e édition, p. D-1 (1964).

- (23) JOHNSON O.H. et LARDY H., "Methods in Enzymology", éd. Academic Press Inc., 10, 94-96 (1967).
- (24) GONALL A.G., BARDAWILL C.J. et DAVID M.M., J. biol. Chem., 177, 751-766 (1949).
- (25) DUNCOMBE W.G. et RISING T.J., Biochemical pharmacology, 21, 1075-1088 (1972).
- (26) FOSTER D.W. et BLOOM B., Biochim. biophys. Acta, 60, 189-191 (1962).
- (27) MARCUS A. et VENNESLAND B., J. biol. Chem., 233, 727-733 (1958).
- (28) ROUS S., travaux non publiés (août 1966).
- (29) DUPUIS G. et FAVARGER P., Helv. Physiol. Acta, 21, 300-311 (1963).
- (30) DUCHEMIN A. et FAVARGER P., Helv. Physiol. Acta, 21, 1-9 (1963).
- (31) BARTLEY W., BRITT L.M. et BANKS P., "The Biochem. of the Tissues", éd. John Wiley, 69-71 (1968).
- (32) FAVARGER P. et GERLACH J., Bull. Soc. Chim. biol., 42, 327-335 (1960).
- (33) FIESER F. et FIESER M., "Advanced Organic Chemistry", Reinhold Publishing Corporation, New York, 407-409 (1962).
- (34) KREBS H.A., "Advances in Enzyme Regulation", éd. G. Weber, Pergamon Press, 5, 409-434 (1967).
- (35) ROUS S., FEBS Letters, 12, 338-340 (1971).
- (36) ROUS S., Life Sciences, 12/II, 307-315 (1973).

